

**Transkriptionsversuche an Oligonukleosomen
mit isolierten eukaryontischen und bakteriellen
RNA Polymerasen**

Gert O. Pflugfelder

1980



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548314_0023

Transkriptionsversuche an Oligonukleosomen
mit isolierten
eukaryontischen und bakteriellen RNA Polymerasen

Inaugural Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Fakultät Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von

Gert O. Pflugfelder
aus Duisburg

Juli 1980



1. Berichterstatter Priv.Doiz. Dr. J. Sonnenbichler
 2. Berichterstatter Prof. Dr. E. L. Winnacker
- Tag der mündlichen Prüfung 19.12.1980

Inhalt

I	Einführung	1
II	Materialien und Methoden	4
1.	Materialien	4
2.	Methoden	6
2.1	Präparative Methoden	6
2.1.1	Reinigung von Zellkernen aus Rattenleber	6
2.1.2	Reinigung von Zellkernen aus Kalbsthymus	6
2.1.3	Darstellung von Oligonukleosomen aus Rattenleberzellkernen	7
2.1.4	Reinigung von RNA Polymerase B aus Rattenleberzellkernen	8
2.1.5	Reinigung von RNA Polymerase B aus Kalbsthymus	9
2.1.6	Darstellung von Heparin Sepharose	11
2.1.7	Isolierung von ($[(3)H]$) pBR322 aus E. coli HB 101	12
2.1.8	Darstellung von $[(3)H]$ pBR322/HaeIII Restriktionsfragmenten	13
2.1.9	Deproteinisierung von Nukleinsäuren	13
2.1.10	Abtrennung säurefällbarer Nukleinsäuren von niedermolekularem Material (Nukleosidtriphosphate, Salze) durch Gelpermeationschromatographie	14
2.1.11	Isolierung von DNA-freier RNA	14
2.2	Analysenmethoden	14
2.2.1	Proteinbestimmungen	14
2.2.2	DNA Bestimmungen	16
2.2.3	Bestimmung der Säurelöslichkeit von Nukleinsäuren	16
2.2.4	Sulfatbestimmung in Mucopolysaccharidhydrolysaten	16
2.2.5	Längenbestimmung von RNA Transkripten durch Bestimmung des UMP/U Verhältnisses	17
2.2.6	Trennung und Quantifizierung von Nukleosiden und Nukleotiden auf PEI Cellulose (UMP/U)	18
2.3	Elektrophoresen	18
2.3.1	Proteinelektrophorese unter nicht-denaturierenden Bedingungen	18
2.3.2	Proteinelektrophorese auf SDS-haltigen Polyacrylamidgelen	19
2.3.3	Elektrophorese von DNA Fragmenten unter nicht-denaturierenden Bedingungen	19
2.3.4	DNA Elektrophorese in Agarose Gelen	19
2.3.5	Elektrophorese denaturierter Nukleinsäuren in Formamid-Polyacrylamidgelen	20
2.3.6	Elektrophorese denaturierter Nukleinsäuren in Harnstoff Polyacrylamidgelen	21

2.4	Methoden zur Aktivitätsbestimmung von Enzymen	21
2.4.1	Bestimmung der RNA Polymerase - und template Aktivität	21
2.4.2	Aktivitätsbestimmung von Micrococcus Nuklease	24
2.4.3	Aktivitätstest für DNase I	24
2.4.4	Aktivitätstest für DNA Topoisomerase I und Endonukleasen	24
2.5	Fluorographie	25
2.6	Photographieren unter UV Licht	26
2.7	Elektronenmikroskopie	26

III	Ergebnisse und Diskussion	28
IIIA	Isolierung und Charakterisierung von Bestandteilen der Transkriptionssysteme	28
1.	Reinigung von Zellkernen aus Rattenleber	28
2.	Isolierung und Charakterisierung von Nukleosomen	30
2.1	Aktivität der Micrococcus Nuklease	30
2.2	Verdau von Zellkernen mit Micrococcus Nuklease	32
2.3	Fraktionierung von Nukleosomen	38
2.3.1	Sucrosegradientenzentrifugation	38
2.3.2	Gelpermeationschromatographie	41
2.3.3	.1 DNP - H ¹ Trennung auf Sepharose C1 4B	42
2.3.4	.2 Isolierung von Mononukleosomen und Core Partikeln auf Sepharose 6B und Biogel A 5m	43
2.4	Charakterisierung von Nukleosomen	46
2.4.1	Analyse nukleosomaler DNA Längen	46
2.4.2	Elektronenmikroskopie	47
3.	Isolierung und Charakterisierung von RNA Polymerase B aus Rattenleber	51
3.1	Einführung	51
3.2	Extraktion der RNA Polymerasen aus den Zellkernen	52
3.2.1	Einfluß der Ionenstärke	52
3.2.2	Einfluß der Beschalldauer	52
3.3	Vorbereitung des Chromatinzentrifugates für chromatographische Folgeschritte	54
3.3.1	Ammoniumsulfatfällung	54
3.3.2	Rattenleber enthält einen stimulierenden Faktor für Pol B	57
3.3.3	Polyethyleniminfallung	59
3.3.4	Polyethylenglykolfällung	61
3.4	Chromatographie	65
3.4.1	DEAE Sephadex Chromatographie nach Ammoniumsulfatfällung	65
3.4.2	Heparin Sepharose Chromatographie nach PEG Fällung	65
3.4.3	DEAE Sephadex Chromatographie nach Heparin Sepharose	68
3.5	RNA Polymerase C in Rattenleberzellkernen ?	69
3.6	Zusammenfassende Betrachtung der Reinigung	69

3.7	Elektrophoretische Charakterisierung der RNA Polymerase B aus Rattenleber	72
4.	Isolierung und Charakterisierung von RNA Polymerase B aus Kalbsthymus	75
4.1	Extraktion der RNA Polymerasen aus dem Kalbsthymusgewebe	75
4.2	Vorbereitung des Chromatinzentrifugats für chromatographische Folgeschritte	77
4.2.1	PEI Fällung im Chromatinzentrifugat	77
4.2.2	Ammoniumsulfatfällung	78
4.2.3	PEG Fällung	79
4.3	Chromatographie	83
4.3.1	DEAE Chromatographie nach PEG Fällung	83
4.3.2	Heparin Sepharose Chromatographie	84
4.3.3	Sepharose Cl 4B Chromatographie. Heparin ist für den chromatographischen Effekt von Heparin Sepharose Cl 4B verantwortlich.	85
4.3.4	DEAE A 25 und DE 52 Chromatographie	86
4.3.5	CM Sephadex Chromatographie	91
4.4	Konzentration von verdünnten Enzymlösungen hoher spezifischer Aktivität. Fällung mit PEG	92
4.5	Zusammenfassende Betrachtung der Reinigung	94
4.6	Elektrophoretische Charakterisierung des Enzyms	97

1.	Transkriptionsversuche mit isolierten Rattenleberzellkernen	102
1.1	Einfluß der Kernkonzentration im Transkriptionsansatz auf die RNA Synthese	102
1.2	Einfluß der Temperatur	103
1.3	Einfluß der spezifischen Aktivität und Konzentration von $[(3)H]$ UTP	104
1.4	Puffersysteme für die Transkription	105
1.5	Bedingungen zur Fällung radioaktiver RNA	107
1.6	Methoden der Kernlagerung	108
2.	Transkription von Nukleosomen und nukleosomaler DNA	110
2.1	Oligonukleosomen als Modellsystem für Chromatintransskription	110
2.2	Relative template Effizienz von Oligonukleosomen	114
2.3	Transkriptionskinetik unter Reinitiationsbedingungen	117
2.4	Längenbestimmung der RNA Transkripte	118
2.5	Zahl der Bindungs- und Initiationsstellen auf Oligonukleosomen	121
2.5.1	Diskussion der Methoden	121
2.5.2	Bestimmung der relativen Zahl von Initiationsstellen für E. coli RNA Polymerase auf Oligonukleosomen. Elongation bei hoher Ionenstärke.	123
2.5.3	Bestimmung der relativen Zahl von Initiationsstellen für E. coli RNA Polymerase auf Oligonukleosomen. Elongation in Gegenwart von Rifampicin.	125
2.5.4	Bestimmung der Zahl von Bindungsstellen für E. coli RNA Polymerase auf Oligonukleosomen. Elongation bei hoher Ionenstärke.	126
2.5.5	Vorversuche zur Bestimmung der Initiationsstellen für E. coli RNA Polymerase auf Oligonukleosomen über die Zahl der 3' terminalen RNA Enden	131
2.6	Hypothese : Längenabhängige vollständige Transkription von Oligonukleosomen durch eine Subpopulation der E. coli RNA Polymerase Präparation.	134

2.7	Transkription von template Verdünnungsreinen bei erlaubter Reinitiation. Vergleich von Polymerase B mit E. coli RNA Polymerase	139
2.8	Transkription mit Polymerase B in Gegenwart von Rifamycin AF/013	158
2.9	Salzabhängigkeit der Transkription	161
2.10	Temperaturabhängigkeit der Transkription mit Polymerase B	166
IV	Zusammenfassung	169
V	Literatur	171

Abkürzungen

AA	Acrylamid
Akt.	Aktivität
Ama	α -Amanitin
AS	Ammoniumsulfat
b(p)	Base(npaare)
Bis	Bisacrylamid
BSA	Rinderserumalbumin
CM	Carboxymethyl-
cpm	counts per minute
CT	Kalbsthymus
D(i)	doppelsträngiges DNA Fragment (i x 200 bp)
DABA	3,5 - Diaminobenzoessäure
DE	Diethylaminoethyl-
DEAE	"
DNP	Deoxyribonukleoprotein
DTE	Dithioerythritol
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure
I	Ionenstärke
kD	kiloDalton
MN	Micrococcus Nuklease
n(i)	Oligonukleosomen (i Nukleosomen)
nCT DNA	native Kalbsthymus DNA
NHCP	Chromosomales Nicht-Histon Protein
NS	Niederschlag
NT	Nicht bestimmt
NTP	Ribonukleosidtriphosphat
PAA	Polyacrylamid
PCA	Perchlorsäure
PEG	Polyethylenglykol
PEI	Polyethylenimin
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
Pol	RNA Polymerase (Nukleosidtriphosphat : RNA Nukleotidyltransferase E.C. 2.7.7.6)
PPO	Diphenyloxazol
PuTP	Purinribonukleosidtriphosphat
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ss	Schwachsinn
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetraethylmethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TX 100	Triton X 100
u	unit (Enzymeinheit) und Abk. für mikro
ÜF	Überflüssige Frotzelei
ÜS	Überstand
Vol.	Volumen

I Einleitung

In neueren reviews über Chromatin (Elgin u. Weintraub, 1975; Kornberg, 1977; Pederson, 1978; Felsenfeld, 1978; Chambon, 1978; Sonnenbichler, 1979) taucht die Bezeichnung " Chromatin " im Titel und in den Kapitelüberschriften auf - im Text praktisch nicht. Nach einer Definition von Chromatin sucht man in diesen Arbeiten vergeblich. Ganz anders reviews, die vor 1975 entstanden sind : Sonnenbichler (1974) gibt eine gründliche Diskussion des Chromatins und auch eine Definition : " Das durch biochemische Methoden isolierte Chromosomenmaterial nennt man Chromatin " . Diese karge Aussage ist das Ergebnis einer mit Miescher beginnenden über hundertjährigen Forschung, hauptsächlich analytischer Natur, über das im Zellkern enthaltene Material.

Eine Wende für die Chromatinforschung und eine explosive Entwicklung brachte die Entdeckung des Nukleosoms als Baustein des eukaryontischen Chromosomenfadens, die in den Jahren 1973, 1974 in mehreren Arbeitsgruppen mit verschiedenen Arbeitsmethoden beinahe gleichzeitig gemacht wurde : Elektronenmikroskopie (Woodcock, 1973; Olins u. Olins, 1974), endogene Nukleolyse von Zellkernen (Hewish u. Burgoyne, 1973), Verdau mit Micrococcus Nuklease (Noll, 1974), Röntgenbeugung (Pardon et al., 1967), Vernetzung von Histonen und Folgerungen aus der Histonstöchiometrie (Kornberg u. Thomas, 1974; Kornberg, 1974).

Dieses Nukleosom besteht aus je zwei Molekülen der "core" Histone H2A, H2B, H3 und H4 und aus etwa 200 bp DNA, die mit einer oder zwei Windungen (vgl. Wang, 1979) um das Histon Oktamer gewunden sind.

Die meiste, wenn nicht die gesamte DNA des eukaryontischen Zellkerns, liegt in Form nukleosomaler Ketten vor, die ihrerseits zu höheren Strukturen organisiert sind. Bereits die nächst-höhere Organisationsform der DNA nach dem Nukleosom, die auch erst einen Bruchteil der DNA Kompaktion liefert mit der die DNA im Zellkern vorliegt, ist umstritten (uniformes Solenoid vs. Kette aus diskreten Superbeads) und sei hier nicht besprochen.

In der vorliegenden Arbeit sollte daher die Transkription von Chromatin auf der untersten, aber bislang einzig eingehender untersuchten Organisationsstufe, der des Nukleosoms und der Oligonukleosomen, untersucht werden. Transkriptionsuntersuchungen an Chromatin sind seit Mitte der 60-iger Jahre vorgenommen worden. Der Gegenstand der meisten dieser Untersuchungen war die Spezifität der Genexpression. Diesen Arbeiten lag der Befund zugrunde, daß transkriptionell aktive Bereiche des Zellkerns lockerer organisiert sind (Euchromatin) als transkriptionell inaktive (Heterochromatin) (Littau et al., 1964). Daraus leitete sich die Vorstellung ab, daß die Genexpression mechanisch, über die Struktur des Chromatins, reguliert sein

könnte, und daß daher auch heterologe, bakterielle RNA Polymerasen in der Lage sein könnten, offene Strukturen zu erkennen und die darin enthaltene DNA zu transkribieren. Diese Vorstellung wurde durch eine große Zahl von Versuchen erhärtet, in denen es gelang mit *E. coli* RNA Polymerase auf Chromatin eine spezifische Transkription, d.h. eine, die dem *in vivo* Muster des untersuchten Zelltyps folgte, zu erreichen. Ergebnisse der letzten drei Jahre zeigten aber, daß die gefundene spezifische Transkription weitgehend ein Artefakt darstellte, bedingt durch die Kontamination von Chromatin mit RNA und durch die Fähigkeit von *E. coli* RNA Polymerase, auch RNA zu transkribieren und naszierende RNA zu elongieren (Crouse et al., 1979; Maryanka et al., 1979).

Wegen der schwereren Zugänglichkeit von eukaryontischen RNA Polymerasen wurden mit diesen Transkriptionsuntersuchungen erst in neuerer Zeit vorgenommen. Diese zeigen, daß entgegen anfänglichen Berichten (Parker u. Roeder, 1977), die spezifische Transkription von DNA mit eukaryontischen RNA Polymerasen die Organisation von DNA in nukleosomale Strukturen nicht erfordert (Wu, 1978, 1980; Birkenmeier et al., 1978; Mattoccia et al., 1979; Weil et al., 1979a,b; Wasylyk et al., 1980).

Diese neuen Ergebnisse (vgl. auch Engelke et al., 1980) machen eine Bedeutung des Nukleosoms für die Spezifität der einzelnen Transkriptionsschritte, wie Initiation usw., unwahrscheinlich, schließen aber nicht aus, daß über Veränderungen der Chromatinstruktur die Zugänglichkeit bestimmter Genabschnitte moduliert werden kann.

Chromatin ist sowohl für bakterielle wie für eukaryontische RNA Polymerasen ein schlechteres template als nackte DNA. Diese Inhibition der template Aktivität von DNA durch chromosomale Proteine wurde bereits bei den ersten Transkriptionsversuchen festgestellt. Bonner et al. (1968) fassen frühe Befunde zusammen, die in erster Linie die Histone, weniger die chromosomalen Nicht-Histon Proteine für die template Inhibition verantwortlich machen. Die vorliegende Arbeit sollte versuchen zu klären, ob die template Inhibition durch Histone auch auf der Strukturebene des Nukleosoms existiert oder ob sie eine Folge der Organisation in höhere Strukturen ist.

Nach Erkenntnissen aus Hybridisierungsexperimenten sind auch transkriptionell aktive Gene nukleosomal organisiert (Lacy u. Axel, 1975; Kuo et al., 1976; Reeves, 1976). Aber selbst bei "single copy" Genen besteht durch Diploidie und eine potentielle Heterogenität der untersuchten Zellpopulation die Möglichkeit, daß transkriptionell aktive und inaktive Formen eines Gens nebeneinander vorliegen und daß dadurch eine nukleosomale Organisation vorgetäuscht wird, die möglicherweise nur für das transkriptionell inaktive Gen gilt.

Nach elektronenmikroskopischen Aufnahmen sind ribosomale Gene nicht nukleosomal organisiert (Franke et al., 1976; Scheer u. Zentgraf, 1978). Auf mRNA-codierenden Genen

scheint die Nukleosomendichte mit der Transkriptionsfrequenz abzunehmen (Laird et al., 1976; Puvion-Dutilleul et al., 1978; Lamb u. Daneholt, 1979). Der anscheinende Widerspruch zwischen Hybridisierungsexperimenten und Elektronenmikroskopie könnte bedingt sein durch die veränderte Struktur von Nukleosomen aus transkriptionell aktiven Bereichen (s. Chambon, 1978). Diese Struktur ist möglicherweise labiler als die von Nukleosomen aus inaktiven Bereichen und könnte daher die Präparation für die Elektronenmikroskopie mit den dabei auftretenden Scherkräften nicht intakt überstehen.

Die Transkribierbarkeit des Nukleosoms sollte daher, im Gegensatz zu den bislang angewandten indirekten Methoden, in der vorliegenden Arbeit direkt in vitro untersucht werden. Die Verwendung isolierter Oligonukleosomen definierter Stöchiometrie und Kettenlänge sollte Schwierigkeiten ausschalten, die bei der Verwendung heterogener Chromatinpräparationen entstehen können. Oligonukleosomen wurden dabei mit den aus ihnen extrahierten DNA Fragmenten verglichen. Nackte und nukleosomale DNA wiesen so die gleiche Sequenzkomplexität und die gleichen DNA Schnittstellen auf und gewährleisteten, daß sich der Unterschied der beiden templates auf die Gegenwart (oder nicht) einer nukleosomalen Organisation beschränkte. Sie stellten damit ein geeignetes Modellsystem dar, um den Einfluß des Nukleosoms auf die Transkription zu untersuchen.

Um ein reines template - Polymerase System zu haben, wurden nur hochgereinigte Enzyme eingesetzt. Die Ausarbeitung von Reinigungsmethoden für die RNA Polymerasen B aus Rattenleber und Kalbsthymus war zeitlich der aufwendigere Teil der vorliegenden Arbeit, nimmt daher in ihr auch einen Raum ein. *E. coli* RNA Polymerase (Geschenk von Prof. Zillig, Martinsried) wurde zu Vergleichszwecken eingesetzt. Auch das bakterielle Genom ist aus repetitiven DNP Strukturen aufgebaut (Rouviere-Yaniv et al., 1979). Daher stellt die Transkription von eukaryontischem Chromatin mit einer bakteriellen RNA Polymerase eine Situation dar, die auch den in vivo Verhältnissen der bakteriellen Transkription nahekommt.

II Materialien und Methoden

1. Materialien

Acrylamid, Serva, Heidelberg
 Actinomycin C, Serva
 Agarose LE, SeaKem, Marine Colloids, Rockland, ME, USA
 Aluminiumoxid, basisch, Aktivitätsstufe 1, Woelm, Eschwege
 Amanitin, Maddaus, Köln (Geschenk)
 Amidoschwarz 10 B, Merck, Darmstadt
 Ampicillin, Sigma, München
 Antischaum, Wacker Chemie, Burgdorf

Bacto Trypton, Difco, Detroit, USA
 Benzidin, Prof. Rembold, Martinsried (Geschenk)
 Bisacrylamid, Serva
 p-Bis-(O-methylstyryl)Benzol, NEN, Dreieich
 Bromcyan, Merck
 Bromphenolblau, Serva
 BSA , Serva

Celluloseacetatfolien, Schleicher u. Schüll, Dassel
 Chloramphenicol, Sigma
 Coomassieblau R 250, Serva

DABA, gold label, Aldrich, Milwaukee, Wis, USA
 DMSO, Merck, pro scintillatione
 DNA, (native Kalbsthymus DNA), Sigma
 DNase I, Merck
 DTE , Serva
 DTT , Serva

EDTA (Titriplex III), Merck
 Ethanolamin, Merck - Schuchardt, Darmsstadt
 Ethidiumbromid, Boehringer, Mannheim

Formamid, Merck

Glasfaserfilter, (GF/C), Whatman, Wiesloch
 Glycerol, Merck

Harnstoff, Merck
 Hefeextrakt, Merck
 Heparin, Serva
 HEPES, Serva

2 - Methylnaphtalin, Aldrich, gold label
 Micrococcus Nuklease, Worthington, Freehold, NJ, USA

Nitrocellulosefilter, Sartorius, Göttingen
Nukleoside, Serva, Boehringer
Nukleosidphosphate, Serva, Boehringer

PEG, Serva
Phenylquecksilberacetat, Sigma
PEI, Serva
PEI - Cellulose, Merck, mit Fluoreszenzindikator
PMSF, Merck
Polyamidfilter, Sartorius
PPO, Koch - Light, Colnbrook, Bucks., England
Protease K, Boehringer

Rifampicin, Serva
Rifamycin AF/013, Lepetit, Mailand (Geschenk)

SDS, Serva

TEMED, Serva
Thioglycolsäure, Serva
Tris, Baker, Deventer, Holland
tRNA (E. coli), Boehringer
TX 100, Serva

UMP Agarose, Miles, Frankfurt

Xylencyanol FF, Serva

Alle anderen Chemikalien wurden im höchsten Reinheitsgrad
von den üblichen Herstellern bezogen.

2. Methoden

2.1 Präparative Methoden

2.1.1 Reinigung von Zellkernen aus Rattenleber

Nach Entnahme der Lebern wurden alle Operationen bei 0 - 4 °C durchgeführt.

Die Ratten wurden durch Ethernarkose getötet. Die Lebern wurden entfernt und 5 mal mit 0,9 % NaCl gewaschen. Je eine Leber wurde mit 60 ml 0,32 M Sucrose, 2 mM Magnesiumchlorid, 10 mM Tris-HCl, pH 7,0 in einem Motor-getriebenen Glas - Teflon Potter homogenisiert (Antriebstyp 201, Fa. Heidolph, Heidenheim) (bei 2500 upm zwei, bei 5000 upm drei Stöße). Das Homogenisat wurde durch vier Lagen Verbandsmull filtriert und in 90 ml Portionen 15 min bei 1400 g abzentrifugiert (Minifuge, Heräus-Christ, Osterode, 3000 upm). Die Niederschläge wurden mit 2,2 M Sucrose, 1 mM Magnesiumchlorid, 10 mM Tris-HCl, pH 7,0 in einem 30 ml Glaspotter mit 4 Stößen von Hand homogenisiert. 48 Ratten ergaben 1200 ml Homogenisat. Davon wurden je 200 ml über 50 ml 2,2 M Sucrose (s.o.) in Polycarbonatbechern (Fassungsvermögen 250 ml) überschichtet. Die Kerne wurden 90 min bei 20000 upm abzentrifugiert (A54 Rotor, IEC B60 Zentrifuge). Flotat und Überstand wurden mit der Wasserstrahlpumpe abgezogen. Das weiße Kernpellet wurde, wenn nicht anders erforderlich, in einem Glycerol-haltigen Puffer resuspendiert, mit 4 Stößen in einem Glas Potter homogenisiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. I.A. wurde ein Einfrierpuffer nach Fodor u. Doty (1977) verwendet : 25 % Glycerol, 5 mM Magnesiumchlorid, 10 mM Tris, 0,2 mM EDTA, 5 mM DTE, pH 7,5.

2.1.2 Reinigung von Zellkernen aus Kalbsthymus

Zellkerne aus Kalbsthymus wurden nach Blobel u. Potter (1966) und Steinmetz et al. (1978) isoliert. Alle Operationen fanden bei 0 - 4 °C statt.

TKC Puffer	50 mM Tris (pH 7,5)
	25 mM KCl
	5 mM Calciumchlorid
Hewish-Burgoyne Puffer (Hewish u. Burgoyne, 1973).	
	15 mM Tris (pH 7,4)
	15 mM NaCl
	15 mM 2-ME
	60 mM KCl
	340 mM Sucrose
	0,5 mM Spermidin
	0,15 mM Spermin

7 g Kalbsthymus (CT) wurden in 50 ml TKC Puffer, 1 mM PMSF, 0,2 % TX100 aufgetaut und in einem "loose-fitting", Motor-getriebenem Glas-Teflon Potter (s. 2.1.1) bei 1000 upm mit 6 Stößen homogenisiert. 50 ml des Homogenats wurden mit 100 ml 2,3 M Sucrose in TKC Puffer, 1 mM PMSF gemischt. Je 30 ml dieser Mischung wurden über 9 ml eines Polsters aus 2,3 M Sucrose im gleichen Puffer in 39 ml Zentrifugenbechern geschichtet. Die Kerne wurden durch das Polster zentrifugiert (60 min, 20000 upm, Kontron SW30 Rotor) und mit insgesamt 15 ml 0,25 M Sucrose in TKC/PMSF Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde in einem 15 ml Handpotter mit 8 Stößen homogenisiert und 15 min bei 1200 upm in einer Christ Minifuge abzentrifugiert. Vom lockeren Kernpellet wurde dekantiert und dieses in 40 ml Hewish-Burgoyne Puffer resuspendiert und mit 4 Stößen in einem Handpotter homogenisiert.

Um die Kernintegrität zu erhalten, mußten alle Homogenisationen sehr vorsichtig erfolgen. Ein Einfrieren in Hewish-Burgoyne - oder in Glycerol-haltigen Puffern führte ebenfalls zu einem Verlust der Kernintegrität.

Die Extinktion auf verschiedenen Stufen der Reinigung wurde gemessen in Proben, die nach Verdünnen in 2 M NaCl, 6 M Harnstoff (1:50 - 1:200) bis zur Homogenität beschallt worden waren. Die Ausbeute auf der letzten Stufe lag zwischen 3200 und 3500 E(260) Einheiten.

2.1.3 Darstellung von Oligonukleosomen aus Rattenleberzellkernen

1,3 x 10⁹ Zellkerne, die als Suspension in Einfrierpuffer (s. 2.1.1) in verschraubbaren Plastikgefäßen portioniert in flüssigem Stickstoff gelagert worden waren, wurden unter fließendem, kaltem Wasser aufgetaut und in einer Christ Minifuge 15 min bei 3000 upm abzentrifugiert. Das pellet wurde in 3 ml Verdauerpuffer (5 mM Natriumphosphat, 2,5 x 10⁻⁵ M Calciumchlorid, 10 % Sucrose, pH 7,0) mit einem dünnen Glasstab resuspendiert, wobei der Niederschlag nach einigen min eine feine Suspension ergab. Die Suspension wurde in einen 5 ml Glaspotter übergeführt, wobei noch mit 1 ml Verdauerpuffer nachgewaschen wurde. Die Reaktion wurde nach 1 min Vorinkubation bei 37 °C mit 750 u Micrococcus Nuklease (Worthington) gestartet und nach 5 min Inkubation mit 100 ul 200 mM EDTA (pH 7,0) und durch Einstellen in Eis gestoppt. Während der Reaktion wurde die sich trübende Suspension jede Minute mit 2 Stößen neu homogenisiert. Der gestoppte Ansatz wurde auf 4 Eppendorfgefäße verteilt und in einem vorher eisgekühlten Rotor 10 min bei 20000 upm in einer Eppendorf Tischzentrifuge abzentrifugiert. Die Überstände wurden in einem Meßzylinder gesammelt und nach Entnahme von Proben zur Bestimmung der Konzentration und Säurelöslichkeit (10 - 20 bzw. 50 ul) zu gleichen Teilen auf 6 vorher bereitete Sucrosegradienten (s.u.) vorsichtig aufgetragen. Die Gradienten wurden 16 h mit 36000 upm bei 4 °C in einem Christ SW40 Rotor zentrifugiert und durch Verdrängen der

Lösung mit 50 % Sucrose entleert, optisch vermessen und fraktioniert (Gilford 240 Spektrophotometer ausgerüstet mit einer Vorrichtung zum Entleeren von Zentrifugenröhrchen und einem linearen Antrieb). Die Verdrängungslösung wurde bei der Vorschubgeschwindigkeit 3 aus einer 20 ml Plastikspritze in die Zentrifugenröhrchen gepumpt. Die verdrängte Gradientenlösung wurde in Fraktionen zu 7 Tropfen in Eppendorfgefäße gesammelt (1 Gradientenvolumen = 30 Fraktionen). Der Fraktionsmarker des Extinktionsschreibers war über ein interface mit dem Fraktionssammler verbunden. Dadurch wurde das Auffinden der richtigen Fraktionen beim poolen der peaks erleichtert.

Herstellung der Sucrosegradienten :

Sucrosegradientenpuffer 160 mM Ammoniumsulfat
50 mM Natriumphosphat
0,2 mM EDTA, pH 7,0

Bei der Verwendung des Christ SW40 Ti Rotors wurden je 6,25 ml von 15 bzw. 30 % Sucroslösungen in Sucrosegradientenpuffer in einem einfachen mechanischen Doppelkammermixgerät zu einem linearen Gradienten in Nitrocelluloseröhrchen gegossen (Nitrocellulose wurde wegen seiner leichten Perforierbarkeit gewählt).

2.1.4 Reinigung von RNA Polymerase B aus Rattenleberzellkernen

benötigte Puffer : Puffer A(x) (Roeder u. Rutter, 1969)
50 mM Tris-HCl (pH 7,9)
5 mM Magnesiumchlorid
0,1 mM EDTA
0,5 mM DTE (DTT)
30 % Glycerol
x mM Ammoniumsulfat

DTE (DTT) wurde erst kurz vor Verwendung der Puffer zugegeben.

Sämtliche Operationen wurden bei 0 - 4 °C durchgeführt.

Die Methode wurde getestet für Zellkerne aus 5 - 35 Rattenlebern. Sie ist hier für 35 Rattenlebern beschrieben. Leberzellkerne weißer Wistarratten wurden nach der Isolierung (s. 2.1.1) i.A. in Portionen von $2,5 \times 10^9$ Zellkernen (entsprechend der Ausbeute aus 5 Rattenlebern) eingefroren. Je nach dem gewünschten Maßstab der Reinigung wurden 1 - 7 Portionen unter kaltem Wasser aufgetaut und 15 min bei 3000 upm in einer Christ Minifuge abzentrifugiert (1400 g). Die pellets der einzelnen Portionen (1 ml) wurden jeweils mit 4,4 ml Puffer A(0) homogenisiert. Zu den Suspensionen wurden je 0,6 ml 3 M AS (der pH - Wert der AS Lösung war so eingestellt, daß er nach 1:10 Verdünnung 7,9 betrug) gegeben. Die resultierenden Chromatingele wurden von Hand gerührt, bis keine Verklumpungen mehr erkennbar waren (10 min). Das Volumen jeder Portion wurde mit 6 ml

Puffer A(300) verdoppelt. Die Chromatinglege wurden weitere 10 min von Hand homogenisiert. Die Portionen wurden einzeln in dickwandigen Zentrifugengläsern beschallt (8 s, Branson sonifier, Modell S75, microtip, Stellung 4, Stromstärke 3 A). Die beschallten Lösungen wurden vereint und die Ionenstärke durch Zugabe von $7 \times 20 = 140$ ml Puffer A(0) erniedrigt. Die Suspension wurde 15 min auf einem Magnetrührer gerührt, danach abzentrifugiert (60 min, 28000 upm, Kontron S28 Rotor, 80000 g). Der Überstand, hier bezeichnet als Chromatinzentrifugat wurde 7 % an PEG 4000 gemacht (7 g/ 100 ml Ausgangsvolumen). Nach 15 min wurde wie oben abzentrifugiert. Im Überssstand wurde die PEG Konzentration auf 25 % erhöht. 30 min nach erfolgter Auflösung wurde wiederum abzentrifugiert (s.o.). Die Niederschläge wurden einzeln mit je 1 ml Puffer A(300) aufgelöst (etwa 2 h). Die erhaltene Lösung wurde auf eine mit Puffer A(300) äquilibrierte Heparin Sepharose Säule aufgetragen (2 x 21 cm). Es empfahl sich dabei die Säule vor jedem Lauf neu zu packen. Nach der Auftragung wurde mit 1,5 Säulenvolumina Puffer A(300) gewaschen, danach mit Puffer A(500) eluiert (1,5 - 2 Säulenvolumina). Fraktionen mit Enzymaktivität wurden gepoolt und gegen Puffer A(0) dialysiert, bis die Salzkonzentration (bestimmt über die Leitfähigkeit) auf 100 mM AS gesunken war. Das Dialysat wurde auf eine DEAE A 25 Säule aufgetragen (7,5 ml Säulenvolumen, äquilibriert mit Puffer A(100)). Die Säule wurde mit Puffer A(100) gewaschen bis die E(280) wieder die Nulllinie erreicht hatte, dann wurde mit Puffer A(500) eluiert.

2.1.5 Reinigung von RNA Polymerase B aus Kalbsthymus

Die Methode wurde für 50 - 360 g Kalbsthymus getestet. Sie wird hier für 360 g beschrieben. Alle Schritte wurden, wenn nicht anders angegeben bei 0 - 4 °C durchgeführt.

benötigte Puffer :

1. HB Puffer A (Hodo u. Blatti, 1977)
 - 10 mM Tris, pH 7,9
 - 25 mM KCl
 - 5 mM Magnesiumchlorid
 - 0,1 mM EDTA
 - 12,5 % Glycerol
 - 0,5 % 2-ME
2. HB Puffer B (Hodo u. Blatti, 1977)
 - 50 mM Tris, pH 7,9
 - 0,1 mM EDTA
 - 0,5 % 2-ME
3. Puffer A(x) (Roeder u. Rutter, 1969)
 - 50 mM Tris, pH 7,9
 - 5 mM Magnesiumchlorid
 - 0,1 mM EDTA
 - 0,5 mM DTE
 - 30 % Glycerol

x mM Ammoniumsulfat

4. Puffer B(x) wie Puffer A, aber ohne Magnesiumchlorid

Kalbsthymusgewebe wurde frisch vom Münchner Schlachthof bezogen, noch vor Ort in flüssigem Stickstoff eingefroren und danach bei - 195,8 oder - 30 °C aufbewahrt. Es wurde, wenn es sich nicht bereits in flüssigen Stickstoff befand, vor der Aufarbeitung kurz mit diesem abgekühlt. Es war danach spröde und ließ sich, in ein Tuch gewickelt, mit einem Hammer leicht zu kleinen Brocken zerschlagen. 90 g Portionen wurden abgewogen und in je 180 ml HB Puffer A aufgetaut. Um das Auftauen zu beschleunigen, wurden die Bechergläser außen mit einem Wassermantel von 10 - 15 °C umgeben und auf Magnetrührern gerührt. Nach etwa 30 min erreichten die Suspensionen so eine Temperatur von 4 - 8 °C. Je eine Portion wurde in einen Braun Küchenmixer gegeben und (u.U. mit einigen Tropfen "Antischaum") je 30 s auf den 3 Stufen des Mixers homogenisiert. 180 ml HB Puffer B wurden zugegeben. Die resultierende Suspension wurde nochmals 30 s auf der niedrigsten Stufe des Gerätes gemixt. Das Homogenisat wurde durch 4 Lagen Verbandsmull filtriert und abzentrifugiert (30 min, 12000 upm, MSE 1,5 l Rotor). Der Überstand (Chromatinzentrifugat) wurde nochmals durch 4 Lagen Mull filtriert und 30 min mit PEI gefällt (4 µl/ml einer 10 % Lösung von PEI 600, pH 7,9). Die Suspension wurde abzentrifugiert (45 min, 12000 upm, MSE) und der Überstand (PEI Überstand) wurde 3 % an PEG 6000 gemacht (Gewichtsprozent pro Ausgangsvolumen, PEG zur schnelleren Auflösung vorher gemahlen). Nach 30 min wurde wiederum abzentrifugiert (30 min, 12000 upm, MSE) und die PEG Konzentration im Überstand wurde auf 25 % erhöht. 30 min, nachdem sich das PEG vollständig gelöst hatte, wurde wie oben zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die 6 pellets in je 50 ml Puffer A(0) aufgelöst. Dazu wurden die käseartigen Niederschläge zuerst mit einem Glasstab zerkleinert. Sie lösten sich danach auf dem Magnetrührer in 2 - 3 h zu einer feinen Suspension. Diese wurde wie oben abzentrifugiert. Die AS Konzentration im Überstand wurde durch festes AS auf 25 % gebracht (= AS Überstand). Die trübe Lösung wurde auf eine mit Puffer A(300) äquilibrierte Heparin Sepharose Säule aufgetragen (3,5 x 34 cm = 330 ml Säulenvolumen). Dabei wurde die Laufgeschwindigkeit, u.U. durch Verwendung einer peristaltischen Pumpe, auf etwa 70 ml/h gehalten. Nach dem Auftrag wurde die Säule mit 1,5 Säulenvolumina Puffer A(300) gewaschen und die Polymerase danach mit Puffer A(500) eluiert. Aktive Fraktionen wurden gepoolt und gegen Puffer B(100) dialysiert. Das Dialysat wurde auf eine DE 52 Säule aufgetragen (äquilibriert mit Puffer B(100), Säulenvolumen 30 ml, Laufgeschwindigkeit 50 ml/h). Die Säule wurde mit je 1 - 2 Säulenvolumina Puffer B(100,150,175,200 u. 500) gewaschen und eluiert.

2.1.6 Darstellung von Heparin Sepharose

Die Kopplung von Heparin an Sepharose erfolgte nach Axen et al. (1967) durch Bromcyanaktivierung. Die Ausbeute an gebundenem Heparin stieg mit der Heparinkonzentration. Aktivierung und Kopplung waren durch unterschiedliche Reaktionsmaßstäbe nicht beeinflusst (Reaktionen mit 150 - 500 ml gepacktem Gelvolumen wurden untersucht). Im folgenden ist die Methode für 500 ml Gelvolumen beschrieben. Die Arbeiten wurden in einem Abzug vorgenommen. 500 ml gepacktes Gel (Sepharose 4B oder 4B Cl), äquibriert in 0,1 M Na(2)CO(3) wurden mit 1 l 0,1 M Na(2)CO(3) gerührt. 25 g frisches Bromcyan (die Kristalle sollten klar, nicht weißlich verwitert sein) gelöst in 500 ml 0,1 M Na(2)CO(3) wurden schnell zugegeben. Der pH - Wert der Suspension wurde kontinuierlich verfolgt und mit 4 M KOH 7 min lang bei 11,5 gehalten (etwa 45 ml KOH wurden benötigt). Danach wurde über eine Fritte abgesaugt. Das Gel wurde resuspendiert und nach jeweils 3 min Rühren in 1 l der nachfolgend aufgezählten Medien wiederum abgesaugt : Wasser (2 mal), 0,1 M NaHCO(3) (2 mal), 0,1 M NaHCO(3) + 1 M NaCl (2 mal). Im letzten Puffer wurde das Gel zu einem Volumen von 700 ml resuspendiert. Die Heparinlösung (1,2 - 5 g in 500 ml 0,1 M NaHCO(3), 1 M NaCl) wurde zugegeben. Nach 24 h Rühren bei Raumtemperatur wurde wiederum abgesaugt und je 2 mal mit 1 l der nachfolgenden Medien gewaschen : Wasser, 1 M Ethanolamin (Iverius, 1971), Wasser, 0,1 M Natriumacetat + 1 M NaCl pH 4,0, Wasser, 0,1 M Na(2) CO(3) + 1 M NaCl, Wasser. Ein Aliquot des gewaschenen Geles wurde zur Bestimmung des Sulfatgehaltes lyophilisiert, der Rest im gewünschten Puffer resuspendiert.

In 5 Präparationen mit unterschiedlichem Verhältnis von Heparin zu Sepharose waren folgende Sulfatgehalte pro mg lyophilisierte Heparin Sepharose gefunden worden (s. 2.2.4).

g Heparin/100 ml Gel	ug Sulfat/mg Heparin Sepharose
0,27	3,45 - 4,8
0,5	6,0 - 6,7
1,0	29

Heparin-Natrium wurde von Serva, Heidelberg bezogen. Nach Firmenangabe hatte das Heparin der ersten 4 Präparationen 168,2 IE/mg (die Analyse ergab einen Sulfatgehalt von 27 %). Das Heparin der letzten Präparation der obigen Tabelle hatte 183 IE/mg (Sulfatgehalt nicht bestimmt). Es kann nicht gesagt werden, ob die überproportionale Zunahme des Sulfatgehaltes mit der Heparinkonzentration den Einfluß der neuen Charge oder eine Charakteristik des Kopplungsprozesses spiegelt.

2.1.7 Isolierung von ([(3)H]) pBR322 aus E. coli HB 101

Trypton broth 1 % Trypton (Bacto Trypton, Difco)
 0,5 % NaCl pH 7,4
 Luria broth 1 % Trypton
 0,5 % Hefeextrakt (Merck)
 0,5 % NaCl
 Zellsuspensionspuffer (CSB) 50 mM Tris-HCl pH 8,0
 25 % Sucrose
 Lytic mix 25 mM Tris-HCl pH 8,0
 62,5 mM EDTA
 2 % TX100

Zur Verhinderung der Schaumbildung wurden den beiden Kulturmedien einige Tropfen "Antischaum" (Wacker Chemie, Burghausen) vor der Sterilisierung zugegeben.

1. pBR322 ohne radioaktive Markierung

E. coli HB 101 mit dem Plasmid pBR322 wurde in 100 ml Trypton broth über Nacht bei 37 °C unter leichtem Schütteln in Vorkultur gezogen. Einige ml der Vorkultur wurden auf 2 l der Hauptkultur (Luria broth) überimpft. Die Hauptkultur wurde über einen Sterilfilter belüftet und ebenfalls bei 37 °C gehalten. Die Zellteilung wurde vor Abbrechen der logarithmischen Wachstumsphase (E(600) 0,6 - 0,8) durch Zugabe von Chloramphenicol ad 250 µg/ml (500 mg in 5 ml Ethanol) gestoppt. Zur Plasmidreplikation wurde über Nacht weiterinkubiert. Zur Ernte der Bakterien wurde die Kultur mit Eis abgekühlt und abzentrifugiert (15 min, 12000 upm, MSE 1,5 l Rotor). Die pellets wurden in insgesamt 15 ml CSB aufgenommen. Die Suspension wurde 2 min bei 0 °C mit 2,5 ml Lysozymlösung (10 mg/ml in CSB) verdaut. Nach Zugabe von 5 ml 200 mM EDTA (pH 7,0) wurde weitere 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden danach durch Zugabe von 15 ml lytic mix lysiert (20 min 0 °C). Der Zelldebris wurde abzentrifugiert (30 min, 16000 upm, MSE18 Rotor). Im Überstand wurden Ethidiumbromid und CsCl gelöst (100 µg/ml bzw. 1 mg/ml, bezogen auf das Ausgangsvolumen). Zur Ausbildung eines Dichtegradienten wurde in einem Christ S60 Rotor 48 - 72 h bei 45000 upm und 15 - 20 °C zentrifugiert. DNA Banden waren bei hoher DNA Konzentration teilweise direkt in den Nitrocellulose Röhrchen sichtbar. Bei geringerer DNA Konzentration wurden die Banden unter UV Licht (254 nm) lokalisiert. Sie wurden durch seitliches Einstechen mit einer 1 ml Spritze abgezapft.

Ethidiumbromid wurde durch dreifache Extraktion mit Isopropanol entfernt (wobei CsCl ausfallen konnte). Die Lösung wurde danach gegen 10 mM Tris, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, pH 7,9 dialysiert.

Die Ausbeute lag bei 1 - 2 mg Plasmid DNA.

Bei Elektrophorese auf 1 % Agarose zeigten alle Plasmidpräparationen 4 Banden, von denen 2 wahrscheinlich von den Kontamination mit einem größeren Plasmid herrührten (vgl. Jorcano u. Ruiz-Carrillo, 1979). Dies änderte sich auch nicht, wenn Vor- und Hauptkultur in Gegenwart von Ampicillin durchgeführt wurden (pBR322 vermittelt Ampicillinresistenz, Bolivar et al., 1977). Die 4 Banden konnten jedoch vollstän-

dig durch eine Sucrosegradientenzentrifugation getrennt werden (10 - 30 Sucrose in 10 mM Natriumphosphat, 1 mM EDTA, pH 6,0, 36 upm, 16 h, Christ SW40 Rotor).

2. [(3)H] pBR322 Die Kultur wurde bis nach der Zugabe von Chloramphenicol wie oben beschrieben behandelt. Zu 100 ml Hauptkultur wurden dann 1 mCi [(3)H] Thymidin (50 uCi/mMol, NEN) gegeben. Die Zellen wurden wie oben beschrieben weiterinkubiert und bei verkleinertem Maßstab aufgearbeitet. Die Plasmid DNA hatte eine spezifische Radioaktivität von 2000 cpm/ug (Zählausbeute 21 %).

2.1.8 Darstellung von [(3)H] pBR322/HaeIII Restriktionsfragmenten

1 ml Plasmidlösung (89 ug/ml, 182000 cpm/ml) wurde mit 40 ul 5 M NaCl und 2 ml Ethanol über Nacht bei - 40 °C gefüllt. Das pellet nach Zentrifugation (15 min, 6000 upm, Christ Minifuge) wurde mit 70 % Ethanol (auf - 40 °C vorgekühlt) gewaschen. Die Überstände enthielten dabei keine Radioaktivität. Der getrocknete Niederschlag wurde mit 200 ul Verdaupuffer (6 mM Tris-HCl, pH 7,4, 6 mM NaCl, 6,6 mM MgCl₂, 6 mM 2-ME) in ein Eppendorfgefäß überführt. Aus einer Stammlösung mit 10(5) u/ml HaeIII wurde mit 50 mM Tris-HCl, pH 7,9, 0,1 mM EDTA, 0,5 mM DTE, 25 % Glycerol eine 1:10 Verdünnung hergestellt. Das Plasmid wurde mit 36 ul dieser Lösung 30 min bei 37 °C verdaut. Die Vollständigkeit des Verdaus wurde durch Elektrophorese (s. 2.2.3) und Fluorographie des Gels (s. 2.5) überprüft.

2.1.9 Deproteinisierung von Nukleinsäuren

Proben aus Sucrosegradienten wurden zuerst gegen einen Puffer niedriger Ionenstärke dialysiert. Die Lösungen wurden 1 M an NaCl oder NaClO₄ und 0,5 % an SDS gemacht (für 1 ml Lösung 266 ul 5 M NaCl und 66 ul 10 % SDS). Sie wurden danach mit 20 ug/ml Protease K 30 min bei 37 °C verdaut. Sollte DNA-freie RNA isoliert werden, wurde die DNA vor dem Proteaseverdaus mit DNase abgebaut (s. 2.1.11). Die Lösung wurde einmal mit einem halben Volumen an Puffer-gesättigtem Phenol (destilliertes Phenol, 0,2 % 8-Hydroxychinolin (w/w, bezogen auf die Phenolmasse), äquilibriert mit 50 mM Tris pH 7,0) und zweimal mit je einem Volumen einer Chloroform/Isopentanol Lösung (24 : 1, v/v) extrahiert. Für funktionelle Untersuchungen wurde die wässrige Phase gegen einen geeigneten Puffer dialysiert.

2.1.10 Abtrennung säurefällbarer Nukleinsäuren von niedermolekularem Material (Nukleosidtriphosphate, Salze) durch Gelpermeationschromatographie

Die wässrige Phase nach Phenolextraktion (s. 2.1.9) (Volumen bis 1 ml) wurde auf eine Sephadex G 25 Säule aufgetragen (1,25 x 9,2 cm, Volumen = 11,3 ml). Die Säule war äquilibriert und wurde eluiert mit 0,2 mM EDTA (pH 7,0). 12 Tropfen pro Fraktion wurden bei Laufgeschwindigkeiten kleiner als 0,35 ml/min in Eppendorfgläser gesammelt. Die Extinktion bei 260 nm wurde in einer Durchflußzelle bestimmt (Uvicord II, LKB, Bromma, Schweden). Der erste peak enthielt die säurefällbare Radioaktivität.

2.1.11 Isolierung von DNA-freier RNA

RNA, frei von DNA, wurde durch Verdau der DNA durch DNase I hergestellt. Kommerzielle DNase Präparationen enthalten RNasen. Diese wurden nach Brison u. Chambon (1976) durch Chromatographie über UMP Agarose entfernt.

1. Entfernung von RNasen aus DNase I

UMP Agarose (Miles) wurde in einer Säule (1 ml) mit 20 mM Tris- HCl pH 7,9 äquilibriert. 2 mg DNase I (Merck, 2000 u/mg) wurden in 1 ml des gleichen Puffers aufgelöst und bei einer Laufgeschwindigkeit von 60 ul/min mit dem Tris Puffer eluiert. 10 ul Aliquots aus den Fraktionen wurden auf DNase Aktivität getestet (s. 2.4.3).

2. DNA Verdau mit DNase I

Deproteinisierte (s. 2.1.10) und durch GPC gereinigte (s. 2.4.3) Nukleinsäuren aus einem Transkriptionsansatz wurden gegen 0,2 mM EDTA (pH 7,0) dialysiert. Das Dialysat wurde unter den Bedingungen des DNase I Testsystems (s. 2.4.3) mit 100 u RNase-freier DNase I 5 min bei 29 °C inkubiert. Danach wurde die Lösung nochmals gegen 0,2 mM EDTA dialysiert und lyophilisiert.

2.2 Analysenmethoden

2.2.1 Proteinbestimmungen

Herkömmliche Methoden zur Proteinbestimmung wie die Biuret- und Lowry Methode, wurden durch PEI und PEG gestört. Diese Reagentien wurden in den Enzymreinigungen viel verwendet, weshalb eine Reihe von anderen Proteinbestimmungsmethoden auf die Störanfälligkeit gegenüber diesen beiden Verbindungsklassen untersucht wurde. PEG störte, bis auf die elektrophoretische, alle der untersuchten Methoden. Gleiches galt für PEI (Filtrationsmethoden wurden mit PEI- haltigen Proben nicht untersucht).

Eine vorherige Fällung der Proteine mit TCA beseitigte die Störung nicht. Bei TCA Zugabe zu PEG-haltigen Lösungen bildete sich eine zweite flüssige Phase aus. Es wurde daher versucht, die flüssigen Phasen vom gefällten Protein durch Filtration zu trennen (Bennett, 1967) und das auf dem Filter zurückgehaltenen Protein nach Hartree (1972) zu bestimmen: Nitrocellulosefilter verfärbten sich im Test, Polyamidfilter waren nicht TCA-resistent und Glasfaserfilter hielten überraschenderweise den Störfaktor zurück. Im Text angegebene Proteinkonzentrationen von PEG- und PEI- haltigen Lösungen sind daher mit einem großen Fehler behaftet.

Es wird im folgenden darauf verzichtet, die Zusammensetzung der Reagenzlösungen, die unverändert aus der Literatur übernommen wurden, im einzelnen anzugeben.

TCA Fällung : Proteinlösungen wurden mit Wasser auf 1 ml aufgefüllt und mit 0,2 ml 50 % TCA gefällt. Nach 15 min bei Raumtemperatur wurden die Proben 15 min in einer Christ Minifuge bei 6000 upm ab zentrifugiert (konische Zentrifugengläser). Der Überstand wurde dekantiert, und das sauber abgetropfte pellet wie bei den einzelnen Methoden beschrieben aufgelöst.

1. Biuretmethode (Beisenherz et al., 1953)

Proteinlösungen wurden auf 2 ml mit Wasser verdünnt und mit 2,5 ml Biuretreagensatz versetzt. War das Protein zuvor mit TCA gefällt worden, wurde das pellet direkt in 5 ml 1:2 verdünntem Biuretreagensatz aufgelöst. Die Extinktion bei 546 nm wurde gegen einen gleichbehandelten Nullstandard gemessen.

Proteinbestimmung nach Hartree (1972)

1 ml Proteinlösung (oder das Proteinpellet nach TCA Fällung gelöst in 1 ml 0,1 N NaOH) wurden versetzt mit 0,9 ml Lösung A und 10 min bei 50 °C inkubiert. Die Lösung wurde durch Einstellen in ein Wasserbad auf Raumtemperatur abgekühlt. 0,1 ml Lösung B wurden zugegeben. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 3 ml Lösung C schnell, unter Mixen, zugefügt. Nach nochmaliger Inkubation für 10 min bei 50 °C und nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 650 nm bestimmt.

3. Proteinbestimmung nach Heil und Zillig (1970)

Bis zu 5 µl Proteinlösung wurden auf Celluloseacetatfolien getupfelt. Die Folien wurden 5 min in Amidoschwarzfärbelösung gefärbt und in Entfärbelösung bis zur vollständigen Farblosigkeit des Hintergrundes entfärbt. Gleich große Flecke wurden ausgestanzt und aufgelöst. Die Extinktion bei 630 nm wurde bestimmt.

4. Proteinbestimmung nach vorheriger elektrophoretischer Trennung der Proteine

Proteine wurde unter nicht-denaturierenden Bedingungen elektrophoretisiert (s. 2.3.1). Nach Färben und Entfärben (s. 2.3.1) wurden die Gele mit einem Gilford Spektralphoto-

meter 240, ausgerüstet mit einer Mechanik für den linearen Vorschub von Gelküvetten, vermessen. Die erhaltenen Kurven wurden planimetriert (Numonics integrator, Gainesville, Florida). Verschieden konzentrierte Lösungen eines Eichproteins wurden in gleicher Weise behandelt und dienten zur Konstruktion einer Eichkurve.

2.2.2 DNA Bestimmungen

Oligonukleosomen fielen bei der beschriebenen Präparationsmethode nur in relativ niedrigen Konzentrationen an. Verschiedene analytische Methoden wurden daher auf Grenzkonzentration und Erfassungsgrenze untersucht : Burton (1956), Keck (1956), LePecq u. Paoletti (1966), Setaro u. Morley (1976). Die fluorometrische Bestimmung der DNA mit 3,5-Diaminobenzoesäure (DABA) nach Setaro u. Morley erwies sich dabei als am empfindlichsten und als relativ schnell durchführbar. Die Gegenwart von Histonen störte nicht, wohl die von Sucrose, weshalb zur DNA Bestimmung, Nukleosomenlösungen vorher ausgiebig dialysiert werden mußten. Der Maßstab wurde gegenüber der Originalvorschrift weiter reduziert.

25 μ l DNA Lösung wurden mit 75 μ l DABA Reagenz (400 mg/ml DABA in Wasser) in kleinen Reagenzgläsern (Fassungsvermögen 2,5 ml) unter Verschuß mit Parafilm 60 min auf 60 °C erhitzt. Nach Abkühlen wurde mit 2 ml 0,6 N PCA verdünnt. Die Fluoreszenz wurde in 1 ml Küvetten bei 520 nm (Anregung 420 nm) in einem Perkin Elmer Fluoreszenzspektralphotometer MPF 3 (Xenonlampe) gemessen.

2.2.3 Bestimmung der Säurelöslichkeit von Nukleinsäuren

DNA- oder Chromatinproben wurden mit 0,4 M NaCl, 0,4 N PCA i.A. 1:20 verdünnt. Nach 10 min Stehen in Eis wurden die Proben bei 20000 upm 10 min in einer Eppendorftischzentrifuge abzentrifugiert. Die Extinktion der Überstände wurde bei 260 nm gemessen.

Als Korrekturfaktor für die Hyperchromizität wurde 0,595 verwendet (Noll u. Kornberg, 1977).

2.2.4 Sulfatbestimmung in Mucopolysaccharidhydrolysaten

Sulfatbestimmungen wurden zur Kontrolle der Kopplungseffizienz bei der Darstellung von Heparin Sepharose durchgeführt. Die Bestimmungen erfolgten kolorimetrisch (Antonopoulos, 1962) oder turbidimetrisch (Jackson u. McCandless, 1978). Beide Methoden waren nicht sehr verläßlich; der ersten wurde der Vorzug gegeben.

Zur Freisetzung des Sulfations wurden eingewogene Mengen des

zu untersuchenden Materials (10 - 20 mg derivatisierte Sepharose) mit 2 ml 25 % Ameisensäure in Reagenzgläsern eingeschmolzen und 24 h oder länger bei 100 °C hydrolysiert. Als Stammlösung für Eichkurven diente eine Lösung mit 137,56 µg/ml Ammoniumsulfat (= 100 µg/ml SO₄) . Niedrigere Konzentrationen wurden daraus durch Verdünnen mit 25 % Ameisensäure hergestellt.

1. Sulfatbestimmung nach Antonopoulos (1962)

0,3 ml Hydrolysat oder Eichlösung wurden in einem konischen Zentrifugenglas mit etwa 10 ml Fassungsvermögen mit 0,5 ml Ethanol, 0,2 ml Benzidinlösung (0,5 % in Ethanol) und 0,5 ml n-Pentanol versetzt und 60 min bei 0 °C stehen gelassen. Der sich bildende Niederschlag wurde abzentrifugiert (15 min, 6000 upm, Christ Minifuge). Der Überstand wurde dekantiert und der Niederschlag resuspendiert mit 1 ml Aceton/Ethanol (1:1), dann mit 0,5 ml n-Pentanol versetzt und nach 15 min wie oben zentrifugiert. Der Niederschlag wurde nochmals mit Aceton/Ethanol resuspendiert und abzentrifugiert. Das Pellet wurde aufgelöst mit 3 ml 1 N HCl und 2 ml Wasser. Freigesetztes Benzidin wurde diazotiert mit 1 ml 0,1 M Natriumnitrit. Nach 3 min bei Raumtemperatur wurden 5 ml Thymollösung zugegeben (0,5 % in 2 N NaOH). Die intensiv roten Lösungen wurden bei 505 nm gegen einen gleichbehandelten Standard gemessen.

2. Sulfatbestimmung nach Jackson u. McCandless (1978)

1 ml Hydrolysat oder Eichlösung wurden mit 1 ml 10 % TCA und 0,545 ml 0,5 % Bariumchlorid in 0,01 % Agarose (SeaKem LE) versetzt. Die auftretende Trübung wurde nach 30 min bei 500 nm gemessen.

2.2.5 Längenbestimmung von RNA Transkripten durch Bestimmung des UMP/U Verhältnisses

Nach beendeter Transkription wurde zu den Proben tRNA zu einer Konzentration von 100 µg/ml gegeben. Die Lösungen wurden phenolisiert (s. 2.1.9) und entweder durch GPC (s. 2.1.10) oder durch Dialyse von niedermolekularen Bestandteilen abgetrennt. Zu den Fraktionen des Ausschlussvolumens, bzw. zu den Dialysaten wurden U, UMP, UTP (je 30 µg pro 500 µl Transkriptionsansatz) zugegeben. Die Lösungen wurden lyophilisiert. Die Rückstände wurden in 0,3 N KOH gelöst (30 µl bei 500 µl Transkriptionsansatz) und in verschlossenen Eppendorfgefäßen 28 h bei 37 °C hydrolysiert. Die Hydrolysate wurden mit 0,3 N PCA neutralisiert (pH - Werte wurden bestimmt durch Tüpfeln von 1 µl Volumina auf Merck - Indikatorstäbchen). Aliquots aus den Überständen nach kurzer Zentrifugation (10 min, 20000 upm, Eppendorffzentrifuge) wurden durch Chromatographie auf PEI Cellulose (s. 2.2.6) aufgetrennt. Die Chromatogramme wurden fluorographiert (s. 2.5), gleichgroße Flächen in den Positionen von UMP und U ausgekratzt, und die darin enthaltene Radioaktivität mit Dioxan Szintillator (s. 2.4.1) gezählt.

2.2.6 Trennung und Quantifizierung von Nukleosiden und Nukleotiden auf PEI Cellulose (UMP/U)

Neutralisierte RNA Hydrolysate (s. 2.2.5) wurden mit Drummond Micropipetten auf PEI Cellulose Platten (Merck, 20 x 20 cm, mit Fluoreszenzindikator) aufgetragen. Getüpfelt wurden, um kleine Flecken zu erhalten, jeweils nur 1 - 2 μ l (Gesamtauftragevolumen bis 10 μ l).

Die Platten wurden entwickelt mit :

1. Wasser, bis 1 cm unter den Plattenrand (etwa 1 h)
2. 0,7 M Ammoniumformiat (pH 3,4), bis 1 cm unter die Wasserfront (etwa 40 min)
3. 2 M Ammoniumformiat (pH 3,4), kürzer als die UMP Laufstrecke aus der zweiten Entwicklung (etwa 15 min)

Zwischen den einzelnen Entwicklungen wurden die Platten kurz in Methanol getaucht, getrocknet und unter UV Licht betrachtet. Alle Entwicklungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Sollten radioaktive Nukleosid(phosphat)e quantifiziert werden, wurden die Platten, um ein Stauben während des Auskratzens zu vermeiden, wie zur Fluorographie (s. 2.2.5) behandelt. Gleich große Flecken wurden ausgekratzt und mit Dioxan Szintillator gezählt (s. 2.4.1).

2.3 Elektrophoresen

2.3.1 Proteinelektrophorese unter nicht-denaturierenden Bedingungen

Die Gele wurden leicht modifiziert nach Krakow et al. (1968) und Kedingen et al. (1974) hergestellt. 4,5 % PAA Gele wurden in Röhrchen (0,6 x 15 cm) ohne stacking Gel verwendet.

Im folgenden ist ein Rezept für 75 ml Gellösung angegeben.

18,75 ml 1,5 M Tris (pH 8,8)

11,25 ml 30 % Acrylamid (Gesamtacrylamid/Bis = 37,5)

480 μ l 10 % Ammoniumperoxodisulfat

25 μ l TEMED

ad 75 ml mit Wasser

Als Elektrophoresepuffer diene : 25 mM Tris, 33 mM Glycin, 10 mM AS, pH 9,0. Zusätzlich (je nach Angabe im Text) enthielt der Puffer 1 mM DTE und 1,4 mM Thioglykolsäure.

Die Elektrophoresen liefen unter Wasserkühlung in einem dafür konstruierten Gerät. Die Elektrodenräume faßten jeweils 1 l Puffer, der nicht umgewälzt wurde. Enthielt der Puffer Thioglykolsäure, so wurde auf eine Vorelektrophorese verzichtet (2 mA/Röhrchen, 45 min). Die Hauptelektrophorese lief bis zur Konzentrierung der Bromphenolblau Bande bei 1 mA/Röhrchen, danach bei der doppelten Stromstärke.

Die Gele wurden nach Burgess u. Jendrisak (1975) mit 0,05 % Coomassie Blau R250 in Ethanol:Eisessig:Wasser (5:1:5) gefärbt und in 7,5 Essigsäure bei 50 °C entfärbt. Sie wurden in einem Gilford Spektralphotometer 240, ausgerüstet mit einem linearen Antrieb, vermessen. Die erhaltenen Kurven wurden planimetriert mit einem Flächenmeßgerät (Numonics integrator, Gainesville, Florida).

2.3.2 Proteinelektrophorese auf SDS-haltigen Polyacrylamidgelen

SDS - Gele wurden nach der Vorschrift von Lämmli und Favre (1973) bei um 20 % reduzierter Amminiumperoxodisulfatkonzentration als slab - Gele gegossen. Die Elektrophorese lief in einer nur einseitig kühlbaren, Horizontalapparatur (Multiphor, LKB, Bromma, Schweden) unter Wassserkühlung bei 150 V und 40 mA. Proteinbanden wurden gefärbt wie in 2.3.1 beschrieben. Vermessen und Integration der Banden erfolgte halbautomatisch mit einem Elscript 2 (Fa. Hirschmann, München).

2.3.3 Elektrophorese von DNA Fragmenten unter nicht-denaturierenden Bedingungen

Aus Nukleosomen extrahierte DNA Fragmente wurden auf 3,5 % Polyacrylamidgelen im Tris-Borat-EDTA Puffersystem von Maniatis et al. (1975) analysiert. Die Vorschrift wurde ohne Abänderung übernommen. Slab- Gele liefen in einer nur einseitig kühlbaren Horizontalapparatur (Multiphor, LKB, Bromma, Schweden). Die DNA Proben wurden in 10 - fach verdünntem Elektrophoresepuffer, der je 0,025 % Bromphenolblau und Xylencyanol FF enthielt, aufgelöst. Die Elektrophoresen liefen bei 30 - 40 mA und 200 V 90 -120 min. DNA Banden konnten nach kurzer Inkubation des Gels in 2 µg/ml Ethidiumbromid, 0,2 mM EDTA unter UV Licht sichtbar gemacht und photographiert werden.

2.3.4 DNA Elektrophorese in Agarose Gelen

Elektrophoresepuffer : 40 mM Tris-Acetat, pH 7,9
 5 mM NaCl
 1 mM EDTA

Die Elektrophorese ergab nur in ungekühlten Vertikalgelen scharfe Banden. Die Multiphor Apparatur von LKB (Bromma, Schweden) führte zu einer starken Verschleppung der Banden. 1 % Agaroselösungen in Elektrophoresepuffer wurden entweder durch Verflüssigen von 2 % portionierten Stammlösungen (wässrige Agaroselösungen erstarren bei 40 °C) im

Wasserbad oder im Mikrowellenofen hergestellt, oder jeweils frisch zubereitet (kurzes Aufkochen). Die festen Stammlösungen hatten bei 0 °C nur eine begrenzte Haltbarkeit (wenige Monate) weshalb letztere Methode bevorzugt wurde. Die warme Gellösung wurde zwischen vorgewärmte Glasplatten gegossen, um ein zu schnelles Erstarren des Gels, und damit Inhomogenitäten zu vermeiden.

Geldimensionen : 12 x 12 x 0,5 cm, 18 Taschen mit 0,5 x 0,15 x 0,3 cm.

Die Elektrophorese lief bei 20 V 15 - 20 h. Die Elektrodenräume der Apparatur faßten je 0,5 l Elektrophoresepuffer, der nicht umgewälzt wurde.

DNA Banden konnten nach kurzer Inkubation der Gele in 2 µg/ml Ethidiumbromid, 0,2 mM EDTA, pH 7,0 sichtbar gemacht und photographiert werden.

2.3.5 Elektrophorese denaturierter Nukleinsäuren in Formamid-Polyacrylamidgelen

Beide Vorschriften zur Elektrophorese in 98 % Formamid basieren auf Maniatis et al. (1975). Um die Polymerisation der Gele zu verbessern wurde in a) die Originalvorschrift um eine Inkubation des gegossenen Gels bei 40 °C über Nacht erweitert. Die Vorschrift b) weicht gegenüber der Originalvorschrift durch die Zugabe des Polymerisationskatalysators TEMED, sowie durch ein direktes Lösen der Puffersalze in 99 % Formamid ab. Gele nach der Vorschrift b) polymerisierten in weniger als 1 h. Angegeben sind die Mengen zur Herstellung von 75 ml Gellösung (5 % Polyacrylamid, Gesamtacrylamid/Bis = 5,7). Formamid (99 %, Merck p.A.) wurde vor der Verwendung 1 h mit 3 % (w/v) Ionenaustauscher (AG 501 X8, BioRad) gerührt und danach von den Gelpartikeln dekantiert.

a) 3,19 g AA und 0,56 g Bis wurden ad 74 ml in Formamid gelöst. Eine Lösung von 213 mg Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat und 40 mg Natriumdihydrogenphosphatmonohydrat in 10 % Ammoniumperoxodisulfat wurde zugegeben. Nach kurzem Entgasen wurde die Lösung in die Gelform gefüllt.

b) Die Phosphate wurden in den oben angegebenen Mengen nach vorherigem Mörsern in 74 ml Formamid über Nacht gelöst. AA und Bis wurden danach wie oben zugegeben. Nach Starten der Polymerisation mit 100 µl TEMED und 200 µl 50 % Ammoniumperoxodisulfat (wässrig) wurde kurz entgast und die Lösung in die Gelform gefüllt.

Probenvorbereitung : lyophilisierte Proben wurden in deionisiertem Formamid aufgelöst und 2 min bei 100 °C denaturiert. Eine Lösung von je 0,075 % Bromphenolblau und Xylencyanol FF und 30 % Glycerol in deionisiertem Formamid wurde zugegeben (1/10 der Probenlösung) und die Proben auf das Gel aufgetragen.

Elektrophoresebedingungen : es wurde in einer Flachbettelek-

trophoresekammer (Multiphor, LKB, Bromma, Schweden) unter einseitiger Wasserkühlung, 3,5 h bei 200 V, ohne Vorelektrophorese elektrophoretisiert. Die Pufferkontakte wurden durch je 5 Blatt Whatman Nr. 1 Papier hergestellt. Die Stromstärke fiel während der Elektrophorese von 50 auf 34 mA. Bromphenolblaulaufstrecke etwa 8 cm. Nukleinsäurebanden wurden wie in beschrieben sichtbar gemacht und photographiert.

2.3.6 Elektrophorese denaturierter Nukleinsäuren in Harnstoff Polyacrylamidgelen

8 % Acrylamidgele (Gesamtacrylamid/Bis = 30) mit 7 M Harnstoff und 1 % SDS wurden ohne Abänderung nach Maniatis et al. (1975) als slab - Gele gegossen. Das Tris-Borat-EDTA Puffersystem wurde verwendet. DNA Proben wurden in 10 - fach verdünntem Elektrophoresepuffer, der um eine starke Probendiffusion nach der Auftragung zu vermeiden ebenfalls 7 M Harnstoff enthielt, aufgelöst und 1 min bei 90 °C denaturiert. Die Elektrophorese lief in der nur einseitig kühlbaren Multiphorapparatur (LKB, Bromma, Schweden) unter Wasserkühlung 2 h bei 300 V und 50 mA. Nukleinsäurebanden konnten nach kurzer Inkubation der Gele in 20 µg/ml Ethidiumbromid, 40 % Ethanol unter UV Licht sichtbar gemacht und photographiert werden.

2.4 Methoden zur Aktivitätsbestimmung von Enzymen

2.4.1 Bestimmung der RNA Polymerase - und template Aktivität

Alle Transkriptionstests wurden, sofern nicht anders angegeben im " HEPES - Puffer " nach Fodor u. Doty (1977) durchgeführt.

50 mM HEPES, pH 8,1

5 mM Magnesiumacetat

12 mM 2-ME

(150 mM KCl)

Die An- oder Abwesenheit von KCl ist jeweils bei den einzelnen Testsystemen vermerkt. Die Testsysteme enthielten zusätzlich 1 mM Manganchlorid, 0,06 mM [(3)H] UTP (5 uCi/ml), 0,6 mM ATP, GTP, CTP.

Standardtest zur Bestimmung der RNA Polymerase Aktivität.

assay-mix(0) :

7,5 ml 1,2 mM ATP, GTP, CTP in 2 x HEPES Puffer (+KCl)

1,5 ml 0,6 mM UTP (50 uCi/ml)

1,5 ml nCT DNA (1 mg/ml in 1 mM NaCl, 0,2 mM EDTA, pH 7,0)

1,5 ml 10 mM Manganchlorid

Assay-mix(2), bzw assay-mix(150) enthielten zusätzlich 2,5 bzw. 187,5 µg/ml Amanitin, so daß die Endkonzentration im

Test 2 bzw. 150 ug/ml betrug.

30 ul Enzymlösung wurden mit 120 ul assay-mix(0,2,150) 10 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde gestoppt durch Zugabe von 50 ul RNA (3 mg/ml, 0,01 % Phenylquecksilberacetat, 1 mM PMSF) und 2 ml eiskalter 10 % TCA, 0,02 M Tetranatriumpyrophosphat. Nach 15 min auf Eis wurden die Proben unter Unterdruck über Nitrocellulosefilter abgesaugt. Die Filter wurden mit je 25 ml 10 und 5 % TCA (beide 0,02 M an Tetranatriumpyrophosphat) gewaschen und danach 30 min bei 60 °C getrocknet. Die erkalteten Filter wurden in Plastiksintillationsgefäßen (20 ml Volumen) mit 5 ml Dioxan-Szintillator 30 min geschüttelt (Gyratory Shaker, New Brunswick Scientific Co., 250 upm).

Dioxan-Szintillator (2 l)

15,6 g PPO (2,5-diphenyloxazol)
0,4 g p-bis-(0-methylstyryl)benzol
120 g Naphtalin
200 ml Methanol
40 ml Ethylenglykol
mit Dioxan ad 2 l

Dioxan war zuvor mit basischem Aluminiumoxid, Aktivitätsstufe 1, getrocknet worden.

Die Proben wurden in einem Packard TriCarb Flüssigkeitsszintillationszähler gezählt (6 x 1 min). Bei langen Probenserien wurden die Meßwerte in Lochstreifen gestanzt, decodiert (punch tape reader, Digitronics) und unter Auslassung der beiden höchsten Werte gemittelt. Die Standardabweichung wurde ebenfalls bestimmt (Multi 8 Computer, Intertechnique, Programm von w. Mayer).

Die Zählflasche betrug unter den Bedingungen 21 % . Durch Multiplikation der erhaltenen cpm-Werte mit dem Faktor 0,000789 wurde die Aktivität der erhaltenen Enzymlösung in u/ml berechnet (1 unit entspricht dem Einbau von 1 nMol UMP in 10 min bei 37 °C).

Testsysteme zur Bestimmung der template Aktivität :

Testsystem 1 (E. coli Polymerase, Reinitiation)

50 ul template
20 ul 3 mM ATP, GTP, CTP in 5 x HEPES Puffer (mit KCl)
5 ul 20 mM Manganchlorid
10 ul 0,6 mM UTP, 50 uCi/ml
10 ul Wasser
5 ul Enzym

Alle Komponenten, bis auf das template wurden bei 0 °C vorgemischt . Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 ul dieses Testmixes gestartet. Inkubation : 10 min bei 37 °C.

Testsystem 2 (Polymerase B, Reinitiation)

40 ul template
20 ul 3 mM ATP, GTP, CTP in 5 x HEPES Puffer (ohne KCl)

5 ul 20 mM Manganchlorid
 10 ul 0,6 mM UTP, 50 uCi/ml
 25 ul Enzym
 gestartet wurde durch Enzymzugabe. Inkubation 10 min bei 37 C.

Testsystem 3 (E. coli Polymerase, Elongation bei hoher Ionenstärke nach Präinitiation)

Vorinkubationsmix :

50 ul template
 20 ul 3 mM ATP, GTP, CTP in 5 x HEPES Puffer mit KCl
 5 ul 20 mM Manganchlorid
 15 ul Enzym

Die Komponenten wurden 15 min bei 37 C vorinkubiert (bei 167 mM KCl). Die Elongation wurde gestartet mit :

10 ul 0,6 mM UTP, 50 uCi/ml
 25 ul 1,6 M AS
 und 10 min bei 37 C fortgeführt. Die Salzkonzentration während der Elongation betrug 120 mM KCl, 0,32 M AS.

Testsystem 4 (E. coli Polymerase, Elongation in Gegenwart von Rifampicin nach Präinitiation)

Vorinkubationsmix s. Testsystem 3 (15 min bei 37 C). Die Elongation wurde gestartet mit
 10 ul 0,6 mM UTP, 50 uCi/ml
 25 ul 50 ug/ml Rifampicin
 und 10 min bei 37 C fortgeführt.

Testsystem 5a) (Polymerase B in Gegenwart von AF/013).

40 ul template
 25 ul AF/013 in DMSO (Konzentration nach Angabe)
 die Reaktion wurde gestartet durch :
 20 ul 3 mM ATP, GTP, CTP in 5 x HEPES Puffer
 5 ul 20 mM Manganchlorid
 10 ul 0,6 mM UTP, 50 uCi/ml
 25 ul Enzym
 und 10 min bei 37 C fortgeführt.

Testsystem 5b) (Polymerase B in Gegenwart von AF/013 und NaCl. Elongation nach Präinitiation)

40 ul template
 20 ul 3 mM ATP, GTP, CTP in 5 x HEPES Puffer
 5 ul 20 mM Manganchlorid
 25 ul Enzym

Vorinkubation 15 min bei 37 C. Die Reaktion wurde gestartet durch :

10 ul 0,6 mM UTP, 50 uCi/ml
 25 ml NaCl Lösung (Konzentration nach Angabe)
 13,9 ul AF/013 in DMSO (Konzentration nach Angabe)
 und 10 min bei 37 C fortgeführt.

2.4.2 Aktivitätsbestimmung von Micrococcus Nuklease

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte nach Heins et al. (1967) (zitiert nach Worthington Enzyme manual, 1972). Enzym und DNA wurden aber in anderen Volumina und Konzentrationen als in der zitierten Literatur zugegeben, wobei die angegebenen Endkonzentrationen beibehalten wurden.

50 ul 200 mM Borat, pH 8,8
 250 ul DNA (1 mg/ml in 1 mM NaCl, 0,2 mM EDTA, nCT DNA)
 5 ul Calciumchlorid (100 mM)
 10 ul BSA (10 mg/ml)

0,1 - 1 ug Enzym

Wasser ad 350 ul.

Nach 30 min bei 37 °C wurden 500 ul 7 % PCA, und nach 10 minütigem Stehen in Eis, 2,7 ml Wasser zugegeben. Die resultierende Suspension wurde 15 min bei 3000 upm in einer Christ Zentrifuge abzentrifugiert und die Extinktion bei 260 nm im Überstand gegen einen gleichbehandelten, aber unverdauten Standard gemessen.

Eine Enzymeinheit entspricht einer Extinktion von 1.

2.4.3 Aktivitätstest für DNase I

Die Aktivität der DNase I wurde nach Kunitz, zitiert nach Worthington Enzyme manual (1972), aber in einem verkleinerten Maßstab durchgeführt. Das Testsystem setzte sich zusammen aus :

100 ul 50 mM Magnesiumsulfat
 100 ul 1 M Natriumacetat (pH 5,0)
 25 ul 1 mg/ml nCT DNA in 1 mM NaCl, 0,2 mM EDTA
 x ul Enzym

mit Wasser ad 1,2 ml.

Die Reaktion wurde bei 25 °C durchgeführt. Die Zunahme der Extinktion bei 260 nm wurde kontinuierlich verfolgt.

1 unit entspricht einer Zunahme der Hyperchromizität von 0,001 E(260)/ min.

2.4.4 Aktivitätstest für DNA Topoisomerase I und Endonukleasen

Die Aktivitäten von Topoisomerasen und Endonukleasen lassen sich durch ihre Wirkung auf circuliäre superhelicale DNA (FI DNA) nachweisen und unterscheiden.

Wegen Komplikationen bei der Messung in Gegenwart von Fremd DNA waren fluorimetrische Tests (z.B. Champoux u. McConaughty, 1976) weniger geeignet als die zwar langwierigere, dafür aber unkomplizierte gelelektrophoretische Methode (Keller u. Wendel, 1974; Shure u. Vinograd, 1976).

2 Lösungen waren für die Tests notwendig :

5 x Test Puffer 50 mM Tris, pH 7,9
 1 M NaCl
 1 mM EDTA

Stopp Lösung 5 % SDS
 0,05 % Bromphenolblau
 25 % Glycerol

Testsystem : 4 ul 5 x Test Puffer
 2 ul Plasmidlösung (etwa 1 ug DNA)
 10 ul Wasser
 4 ul Enzymlösung

Die Ionenstärke im Test sollte 220 mM nicht überschreiten. Die Testansätze wurden 30 min bei 37 °C inkubiert, mit 2 ul Stopplösung gestoppt und wie beschrieben (s. 2.3.4) auf 1 % Agarosegelen elektrophoretisiert.

Das Verschwinden der Bande der FI DNA deutet auf die Anwesenheit von Topoisomerase I und Endonukleasen. Die Enzyme können nach dem Auftreten neuer DNA Formen (FI(r), FII, FIII) charakterisiert werden. Der Test war im wesentlich qualitativ. Halbquantitative Bestimmungen waren durch das Arbeiten mit Enzymverdünnungsreihen möglich.

2.5 Fluorographie

a) von Polyacrylamidgelen

Die Vorschriften zur Imprägnierung der Gele, sowie zur Vorbelichtung und Exponierung des Films wurden unverändert von Bonner u. Laskey (1974) und Laskey und Mills (1975) übernommen. Auf das Wässern und Trocknen der Gele vor dem Exponieren wurde später i.A. verzichtet, da diese beiden Schritte zu einem Verlust der Auflösungsschärfe führten.

Die hier angegebenen Volumina beziehen sich auf ein Gelvolumen von 30 ml, entsprechend etwa 12 Spuren eines Multiphor Slab Geles (LKB, Bromma, Schweden).

1. Die Gele wurden 30 min inkubiert in 600 ml DMSO (Merck, pro scintillatione). Die Lösung wurde auf einem Rüttler in leichter Bewegung gehalten.

2. Nach Dekantieren und Absaugen des DMSO, Wiederholung von Schritt 1.

3. DMSO wurde wiederum entfernt. Das Gel wurde mit 120 ml einer 22,2 % Lösung von PPO in DMSO (w/v) 3 h bei leichter Bewegung inkubiert. Gleichmäßige Bedeckung des Gels mit der Lösung, sowie Schützen gegen Austrocknen waren notwendig.

4. Auf Wässern der Gele (1 h, 600 ml Wasser) wurde i.A. verzichtet.

5. Auf Trocknen der Gele (über einer porösen Platte im Wasserstrahlvacuum) wurde i.A. verzichtet.

6. DMSO-feuchte Gele wurden auf eine Glasplatte gelegt und außen mit einem Gummiraum umgeben. Die ganze Anordnung wurde danach mit einer dünnen Cellophanfolie abgeschlossen.

7. Kodak X-omat XR-5 Film wurde aus etwa 60 cm Höhe mit einem diffusen (durch Abdecken des Blitzes mit dickem Papier) Lichtblitz vorexponiert.

8. Der Film wurde mit der vorexponierten Seite auf das Gel gelegt und mit einer Glasplatte überdeckt. Für einen gleichmäßigen Kontakt wurden die Glasplatten auf allen Seiten durch Klammern zusammengedrückt.

9. Der Film wurde bei - 70 °C exponiert.

10. Entwickeln und Fixieren erfolgte nach Angaben der Hersteller.

b) Dünnschichtplatten

Die Methode wurde ohne Modifikation von Bonner und Stedman (1978) übernommen.

Eine Lösung von 0,4 % PPO in 2-Methylnaphtalin (Aldrich, gold label) wurde bei 50 - 60 °C flüssig gehalten. Die beschichtete Seite der Dünnschichtplatte wurde in die Lösung getaucht. Die Platte wurde danach zum Abtropfen schräg aufgestellt. Es war vorteilhaft vor dem Kontakt mit dem Film einige Stunden vergehen zu lassen, da bei direkt nachfolgender Exponierung des Films an manchen Stellen des Films nicht durch Radioaktivität verursachte Schwärzungen auftraten. Röntgenfilm wurde wie in Abschnitt a) beschrieben vorexponiert und auf die imprägnierte Seite der Dünnschichtplatte aufgelegt. Zum besseren Kontakt wurde der Film mit einer zweiten Glasplatte auf die Dünnschichtplatte gedrückt. Weitere Behandlungen des Films erfolgten wie in Abschnitt a).

2.6 Photographieren unter UV Licht

Nukleinsäuren wurden auf Gelen oder in Gradienten durch interkalierende Farbstoffe (Ethidiumbromid, Acridinorange) lokalisiert. Zur Dokumentation wurden die Gele unter UV Licht photographiert.

Negative im Normalformat wurden mit einer Mamiya Sekhor Kamera (typ 1000 DTL) auf Ilford FP4 Film aufgenommen. Für 9 x 12 cm Negative wurde eine Linhof Kamera (typ 6446) und Agfapan 100 Film verwendet. Die Aufnahmen wurden durch ein Orangefilter (M. Summer, Gräfelfing) bei langen Belichtungszeiten unter Verwendung eines Drahtauslösers gemacht. Teflon war ein geeignetes Hintergrundmaterial mit geringer Eigenfluoreszenz. Die Entwicklung der Filme erfolgte nach Angaben der Hersteller.

2.7 Elektronenmikroskopie

Nukleosomen wurden bei einer Ausgangskonzentration von 35 µg/ml mit 0,5 % Glutaraldehyd 20 min bei Raumtemperatur vernetzt. Das Vernetzen war notwendig, um ein Abstreifen der Nukleosomen von der DNA während der Präparation zu vermeiden. Die Lösungen wurden danach mit Puffer, Wasser und DNA so verdünnt, daß die Nukleosomenkonzentration auf 1/20, die Pufferkonzentration auf 1/5 der Ausgangswerte reduziert

wurden . Mit der DNA wurden dabei die gewünschten $D(i)/n(i)$ - Verhältnisse zwischen 0 und 2 eingestellt. Die Präparation erfolgte nach Dubochet et al. (1971) auf HCCC Kupfer grids, die zuvor einer Glimmentladung in Pentylaminatmosphäre ausgesetzt worden waren. Die grids wurden 30 s mit einem Tropfen der Probenlösung inkubiert, 2 mal 10 s mit Wasser gewaschen, 2 mal 30 s mit 1 % Uranylacetat in 80 % Ethanol angefärbt und nochmals 2 mal mit Wasser gewaschen. Die flüssige Phase wurde zwischen den einzelnen Schritten seitlich mit einem Filterpapier abgesaugt. Die Aufnahmen wurden bei 40000 - facher Vergrößerung mit einem Siemens Elektronenmikroskop gemacht.

III Ergebnisse und Diskussion

IIIA Isolierung und Charakterisierung von Bestandteilen der Transkriptionssysteme.

1. Reinigung von Zellkernen aus Rattenleber

Die Isolierung von RNA Polymerase und Nukleosomen erforderte große Mengen von Zellkernen. Die Reinigung der Zellkerne basierte auf der Methode von Blobel und Potter (1966) in der Modifikation von Machicao und Sonnenbichler (1977) (s. II,2.1.1). Bei dieser Methode werden Lebern homogenisiert. Das Homogenisat wird durch eine kurze Zentrifugation in einen langsam und in einen schnell sedimentierenden Anteil (letzterer enthält die Kerne) getrennt. Der Niederschlag wird mit 2,2 M Sucrose rehomogenisiert und über ein Polster aus 2,2 M Surose abzentrifugiert.

Bei der Vergrößerung des Aufarbeitungsmaßstabes wurde festgestellt, daß die Kernausschüttung empfindlich von der Sucrosekonzentration der Kernsuspension im letzten Reinigungsschritt und vom Auftragevolumen über dem Polster aus 2,2 M Sucrose abhing.

In einem Experiment wurden Rattenlebern homogenisiert und die resultierende Suspension abzentrifugiert (s. II,2.1.1). Aliquots aus dem Niederschlag wurden mit unterschiedlichen Volumina von 2,2 M Sucrose homogenisiert und über ein Sucrosepolster abzentrifugiert. Tabelle 1 zeigt, wie die Kernausschüttung nach dem zweiten Zentrifugationsschritt von dem zur Resuspension verwendeten Volumen an 2,2 M Sucrose abhing. Die Kernausschüttung nahm mit der Erhöhung der Sucrosekonzentration in der aufgetragenen Lösung um mehr als 300 - fach zu.

Tabelle 1 Abhängigkeit der Kernausschüttung von der Sucrosekonzentration

Volumenverhältnis	E(420)	E(420)/Vol(NS)
0 : 10	0,005	0,003
2 : 8	0,013	0,010
4 : 6	0,274	0,290
6 : 4	0,630	1,000

10 ml Aliquots aus dem Niederschlag nach der Homogenisation der Rattenlebern wurden in den angegebenen Volumenverhältnissen (ml 2,2 M Sucrose / ml Niederschlag) mit 2,2 M Sucrose versetzt und in einem "loose-fitting" Glas - Glas Potter homogenisiert. Je 10 ml des resultierenden Homogenisats wurden über 20 ml eines Polsters aus 2,2 M Sucrose geschichtet und abzentrifugiert (90 min, 25000 u_{pm}, SB110 Rotor, IEC). Die pellets wurden in 0,32 M Sucrosepuffer (s. II,2.1.1) resuspendiert und die Kernkonzentration turbidime-

trisch bei 420 nm bestimmt. In der letzten Spalte ist die Turbidität auf die aufgetragene Menge des Niederschlages bezogen und auf 1 normiert.

Tabelle 2 zeigt den Einfluß in der Variation eines weiteren Parameters, des Auftragevolumens. Je kleiner das Auftragevolumen war, desto höher lag die relative Kernaussbeute.

Tabelle 2 Abhängigkeit der Kernaussbeute vom Auftragevolumen im letzten Zentrifugationsschritt

Auftragsvolumen	E(420)	E(420)/Vol(NS)
4 ml	0,146	1,33
7 ml	0,200	1,04
10 ml	0,274	1,00

Niederschläge nach der ersten Homogenisation wurden, wie in Tabelle 1 beschrieben, bei einem Volumenverhältnis von 4 : 6 mit 2,2 M Sucrose homogenisiert. 4, 7 und 10 ml des Homogenisats wurden über Sucrosepolster geschichtet und abzentrifugiert. Zentrifugationsbedingungen und Bestimmung der Kernaussbeute s. Tabelle 1. Die Werte der letzten Spalte sind auf 1 normiert.

Die in den Tabellen 1 und 2 dargestellten Ergebnisse lassen sich durch eine Sedimentation von Zellmaterial auf die Grenzfläche zwischen Homogenat und Sucrosekissen, wodurch diese undurchdringbar wird, erklären. In Experimenten mit geringen Kernaussbeuten war an dieser Stelle die Ausbildung einer Trennschicht erkennbar.

Der Unterschied im Sedimentationsverhalten zwischen Kernen und sonstigem Zellmaterial wird umso größer, je höher die Dichte und die Viskosität des Homogenates ist. Eine hohe Sucrosekonzentration im Homogenat läßt Kerne die Grenzfläche passieren, bevor diese durch langsamer sedimentierendes Material verschlossen wird. Zentrifugationsbecher mit großem Sedimentationsquerschnitt (Winkelrotoren) brachten daher bessere Ergebnisse als solche mit kleinem (swing out Rotoren).

Das im Methodenteil beschriebene Verfahren wurde unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse erstellt. Bei 20 Aufarbeitungen von je 48 Ratten unterschiedlichen Alters und Geschlechts wurde eine durchschnittliche Kernaussbeute von $5 \times 10(8)$ ($SD = 0,56 \times 10(8)$) pro Ratte gefunden. Eine andere Homogenisierungsmethode (Harvard Gewebepresse statt Pottern) ergab dieselbe Kernaussbeute. Kerne, die nach den unterschiedlichen Homogenisierungsmethoden hergestellt worden waren, unterschieden sich auch nicht in ihren Transkriptionseigenschaften, weshalb das schnellere Pottern beibehalten wurde.

2. Isolierung und Charakterisierung von Nukleosomen

Oligonukleosomen waren neben RNA Polymerase das wichtigste Arbeitsmaterial der vorliegenden Arbeit.

Ihre Präparationsmethode basiert auf der für die Nukleosomenforschung grundlegenden Entdeckung von M. Noll (1974), daß Nukleosomen durch den enzymatischen Abbau von Zellkernen mit *Micrococcus Nuclease* (MN) erhalten werden können.

Die Aktivität der MN hängt ab von zweiwertigen Kationen, insbesondere Calcium. Zwertige Kationen stabilisieren außerdem die Kernmorphologie, selbst wenn das Kernchromatin bereits zu Oligonukleosomen fragmentiert ist. Der Abbau mit MN wird gestoppt durch Komplexierung der zweiwertigen Kationen z.B. mit EDTA. Dadurch wird gleichzeitig die Kernstruktur aufgelöst, der Kern lysiert. Durch niedertourige Zentrifugation können dann Oligonukleosomen von weniger degradiertem Chromatin abgetrennt werden.

Da die Transkriptionsuntersuchungen an homologen Serien von Oligonukleosomen durchgeführt werden sollten, wurde die Präparationsmethode so ausgearbeitet, daß etwa gleiche Mengen Nukleosomen der verschiedenen Kettenlängen anfielen. Dies erforderte eine Standardisierung sowohl der Kernaufarbeitung (II,2.1.1), wie der Verdaubedingungen.

Zellkerne aus Rattenleber wurden nach ihrer Darstellung in Puffern, die Mg aber kein Ca enthielten, in einem ebensolchen Puffer in flüssigem Stickstoff eingefroren. So sollte verhindert werden, daß eine in Rattenleberzellkernen vorhandene Ca- und Mg- abhängige Endonuklease (Hewish u. Burgoyne, 1973) bereits vor dem eigentlichen Verdau eine unkontrollierte Aktivität entfaltet.

2.1 Aktivität der *Micrococcus Nuclease*

MN von Worthington wurde zu einer Konzentration von 10000 - 15000 u/ml in Wasser aufgelöst und als Stammlösung bei -20 °C gelagert.

Die Aktivität dieser Lösungen wurde vor einer Verwendung des Enzyms jeweils gemessen, sowohl um unterschiedliche Chargen vergleichen zu können, als auch um einen etwaigen Aktivitätsverlust während der Lagerung ausgleichen zu können.

Zur Bestimmung der absoluten Aktivität in units wurde das im Methodenteil beschriebene Testsystem (s. II,2.4.2) verwendet. Sollte nur die relative Aktivität des Enzyms unter verschiedenen Bedingungen bestimmt werden, wurde wie in der Legende zu Abb. 1 getestet. Die Tests beruhen auf dem Abbau von Doppelstrang DNA zu Nukleotiden und der damit verbundenen Zunahme der Extinktion bei 260 nm (Hyperchromizität).

Abb. 1 zeigt eine leichte Labilität des Enzyms bei hohen Verdünnungen, sowie einen starken Einfluß des Puffers auf die Aktivität des Enzyms.

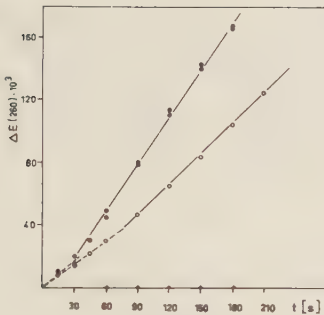


Abb. 1 DNA Abbaukinetiken mit *Micrococcus* Nuklease

nCT DNA wurde in 1 ml Halbmikroküvetten bei 22 °C in einem Zeiss Spektrophotometer PM QII verdaut. Die Ordinate gibt die Hyperchromizität bei 260 nm.

a) 25 µl DNA (1 mg/ml in in 1 mM NaCl, 0,2 mM EDTA), 50 µl MN (100 u/ml in Wasser), 100 µl Borat (100 mM, pH 8,8), 20 µl Calciumchlorid (100 mM), 805 µl Wasser .

b) wie in a) aber 500 µl MN (10 u/ml), 355 µl Wasser (gleiche Menge MN, aber bei höherer Verdünnung eingesetzt)

c) 25 µl DNA, 50 µl MN (100 u/ml), 20 µl Ca, 50 µl Mn (20 mM), 200 µl 5 x HEPES Puffer (250 mM HEPES, 25 mM Magnesiumacetat, 60 mM 2-ME, 750 mM KCl, pH 8,1), 655 µl Wasser

a) ● ——— ●

b) ○ ——— ○

c) △ ——— △

Verglichen mit dem Standardpuffer 10 mM Borat (8,8) hat das Enzym in 50 mM HEPES (8,1), 5 mM Magnesiumacetat, 12 mM 2-ME, 150 mM KCl, 1 mM Manganchlorid keine Aktivität mehr. Daß dies einen Einfluß der Puffersubstanz HEPES und nicht des pH - Wertes oder der zusätzlichen Pufferkomponenten reflektiert, zeigen Versuche mit 50 mM Tris (7,9) (volle Aktivität), 50 mM HEPES (8,8) (keine Aktivität), 5 mM HEPES (8,1) (10 % Aktivität).

Weischet et al. (1979) und Ruiz-Carrillo et al. (1979) beschrieben zudem eine deutliche Inhibition bei hoher Ionenstärke. Dies machte in einigen Experimenten eine Dialyse von Chromatin gegen Borat Puffer notwendig.

Eine Labilität des Enzyms bei hoher Verdünnung wurde berichtet von Cuatrecasas et al. (1967a).

Anfinsen et al. (1963) fanden ebenfalls einen starken Einfluß der Puffersubstanz (Citrat vs. Borat).

2.2 Verdau von Zellkernen mit Micrococcus Nuklease

Abb. 2 zeigt eine Verdaukinetik von Rattenleberzellkernen. Es ist deutlich, daß unter den gegebenen Bedingungen eine Verdauzeit von 5 min am ehesten dem Ziel nahekam, gleiche Mengen der verschiedenen Oligonukleosomen zu gewinnen. In der gezeigten Abbildung wurden nur n(1) bis n(5) untersucht, da nur diese im Sucrosegradienten scharf genug getrennt waren.

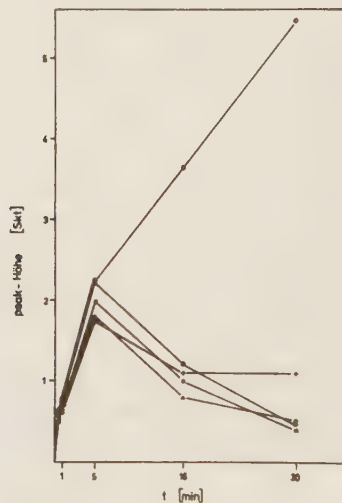


Abb. 2 Abbaukinetik von Rattenleberzellkernen mit Micrococcus Nuklease. Konzentration von Nukleosomen verschiedener Kettenlänge in Abhängigkeit von der Verdauzeit.

Rattenleberzellkerne wurden wie im Methodenteil beschrieben mit MN verdaut. Zu den angegebenen Zeitwerten wurde je ein Aliquot durch EDTA und Eiskühlung gestoppt. Die verschiedenen Lösungen wurden in einem gemeinsamen Lauf über 15 - 30 % Sucrosegradienten (s. II,2.1.3) zentrifugiert. Die Gradienten wurden unter Messung der E(260) fraktioniert. Da bis n(5) die Nukleosomen in symmetrische peaks aufgelöst waren, wurde die peak Höhe als Maß für die relative Konzentration der Nukleosomen verwendet (Kittlaus,1980).

○ — ○ n(1), + — + n(2), ^ — ^ n(3),
□ — □ n(4), ● — ● n(5).

Bei kurzen Verdauzeiten (1 und 2 min) lag die Bildungsgeschwindigkeit von n(5) noch über der von n(1). Befunde dieser Art sind von anderen Autoren als Indiz für

das Vorliegen höherer Chromatinstrukturen gewertet worden (Hozier et al., 1977; Strätling et al., 1978; Renz, 1979; Geraci u. Noviello, 1979; Butt et al., 1979; Kokileva, 1979). Solche Strukturen, "superbeads", seien gebildet aus Ketten von 6 - 12 Nukleosomen. Globuläre Strukturen höherer Ordnung mit 6 - 9 Nukleosomen wurden auch auf zirkulären Minichromosomen beobachtet (Scheer u. Zentgraf, 1978). Dieses diskontinuierliche Modell kontrastiert mit dem Modell eines uniformen Solenoids von Finch u. Klug (1976). Auch die MN Spaltung am Solenoid kann aber nach Thoma et al. (1979) zu einer vorübergehenden Anreicherung von Fragmenten der angegebenen Größe führen.

Bei langen Verdauzeiten erwiesen sich zwei Fragmente als relativ resistent gegen weiteren Nukleaseabbau: Mono- und Dinukleosomen. Daß Mononukleosomen und daraus entstehend core Partikel das Endprodukt des internukleosomalen MN Abbaus darstellen, ist vielfach belegt worden. Der n(2) peak bei langen Verdauzeiten könnte aus "spacerless" Dinukleosomen bestehen, wie sie insbesondere bei der Darstellung von H1 - freiem Chromatin in 0,6 M NaCl beobachtet worden sind (Klevan u. Crothers, 1977; Steinmetz et al., 1978; Spadafora et al., 1979; s.a. 2.3.3.2). Da die Zellkerne bei niedriger Ionenstärke (5 mM Natriumphosphat) in Gegenwart von H1 verdaut wurden, ist es denkbar, daß spacerless n(2) nicht nur als Abbauartefakt gebildet werden, sondern möglicherweise bereits so im Zellkern vorliegen. Eine Heterogenität im Nukleosomenspacing und ein präferentieller Abbau längerer spacer ist mehrfach gezeigt worden (Martin et al., 1977; Lohr u. Ide, 1979; Miki u. Neelin, 1980) (s. auch Abb. 4).

Während des Verdaus unter den beschriebenen Bedingungen ging die ursprüngliche Kernmorphologie verloren (zunehmende Trübung während des Verdaus, Lichtmikroskopie). Abb. 3 zeigt, daß bereits nach 1 min Oligonukleosomen weitgehend freigesetzt waren und daß eine zusätzliche Inkubation der verdauten Kerne nach Stop der Reaktion zu keiner erhöhten Ausbeute an Nukleosomen führte.

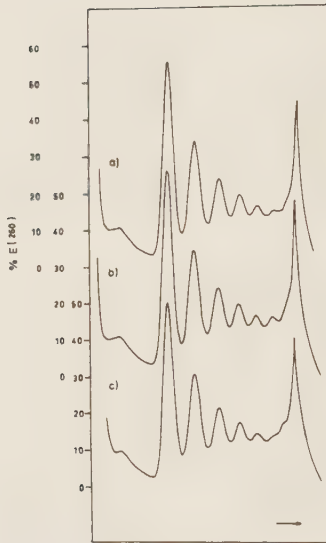


Abb. 3 Einfluß der Lysedauer auf die Freisetzung von Nukleosomen aus dem Zellkern

Rattenleberzellkerne wurden wie im Methodenteil beschrieben, aber mit 1200 u MN verdaut. Die Reaktion wurde gestoppt und Aliquots nach 1, 10 und 60 min Inkubation bei 0 °C in der Eppendorffzentrifuge abzentrifugiert. Die Überstände wurden in einem gemeinsamen Lauf über 10 - 30 % Sucrosegradienten fraktioniert. Sedimentation in Pfeilrichtung.

- a) 1 min
- b) 10 min
- c) 60 min Lysedauer

Abb. 4 zeigt, daß in Abhängigkeit vom Ausmaß eines Verdaus sich nicht nur das Nukleosomenmuster verschob (was auch der Kinetik in Abb. 2 entnommen werden kann), sondern sich auch das Sedimentationsverhalten einzelner Oligonukleosomen geringfügig veränderte.

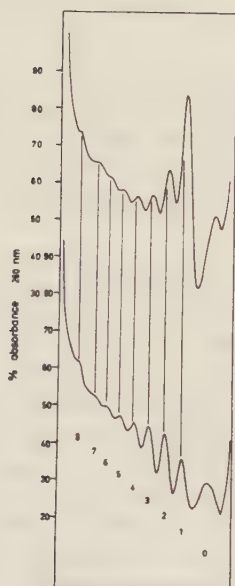


Abb. 4 Oligonukleosomenmuster bei unterschiedlichem Verdaugrad

obere Kurve : $1,3 \times 10^9$ Rattenleberzellkerne wurden nach der Standardmethode (s. II,2.1.3) mit 750 u MN 5 min bei 37 C verdaut.

untere Kurve : wie oben, aber mit 200 u MN, 2 min bei 37 C. Die Fraktionierung der Nukleosomen erfolgte wie im Methodenteil beschrieben (s. II,2.1.3) über 15 - 30 % Sucrosegradienten.

Aus Abb. 4 wird auch deutlich, daß der peak 8 nicht in das sonst uniforme Sedimentationsmuster paßt. Er besteht, anders als die peaks mit $i < 8$ nicht aus einer weitgehend längeneinheitlichen Nukleosomenpopulation, sondern aus einer Mischung höherer Kettenlängen (s.a. Abb. 11). Material aus diesem peak wird dennoch im folgenden als $n(8)$ bezeichnet. Die Verkleinerung der Sedimentationskonstanten, insbesondere der kürzeren Oligonukleosomen mit zunehmender Verdauzeit läßt sich durch zwei Eigenschaften der Micrococcus Nuklease auf Chromatin erklären :

1) MN bei 37 C spaltet die DNA in Zellkernen nicht nur zwischen den Nukleosomen, sondern einmal freigesetzte Chromatinfragmente werden auch von ihren Enden her abgebaut.

Dabei wird H1 freigesetzt. Dies verringert die Sedimentationsgeschwindigkeit der Nukleosomen (Noll u. Kornberg, 1977).

2) Martin et al. (1977), sowie Miki u. Neelin (1980) zeigten, daß in einer Population von Oligonukleosomen eine Heterogenität der spacer Längen existiert. Durch eine präferentielle Nukleolyse längerer spacer kommt es bei längeren Verdauzeiten zu einer Verkürzung der Fragmentlängen und zu einer Verringerung der Längenheterogenität innerhalb der einzelnen Nukleosomenpeaks.

Es gibt Hinweise, daß diese Längenheterogenität der spacer von funktioneller Bedeutung sein könnte. Noll (1976), Morris (1976a,b), Schlegel et al. (1980) beobachteten einen Zusammenhang zwischen spacer Länge und Gehalt und Basizität von H1 und H5.

Von Thomas und Thompson (1977) wurde ein Zusammenhang zwischen spacer Länge und transkriptioneller Aktivität diskutiert. Die neuere Literatur zeigt aber, daß ein solcher Zusammenhang zumindest nicht einheitlich für verschiedene Organismen und Zelltypen besteht (Lipps u. Morris, 1977; Gottesfeld u. Melton, 1978; Weintraub, 1978; Keichline u. Wassarman, 1979; Lohr u. Ide, 1979; Zongza u. Mathias, 1979; Humphries et al., 1979).

Miki u. Neelin (1980) fanden bei längerem Verdau von Erythrozytenchromatin aus Nicht-Säuger Vertebraten verschiedene spacer Längen auf Nukleosomen unterschiedlicher Kettenlänge.

Zusammen mit den Befunden, daß in Oligonukleosomen, die durch MN Verdau erhalten worden sind, in den kürzeren Fragmenten transkriptionell aktive Gene des Ausgangsorganismus angereichert, in den längeren Fragmenten hingegen unterrepräsentiert sind (für transkriptionell stille Gene gilt das umgekehrte) (Bellard et al., 1978; Johnson et al., 1978; Humphries et al., 1979; Levy-Wilson u. Dixon, 1979; Bloom u. Anderson, 1979; Dimitriadis u. Tata, 1980) ergibt sich für die Präparation von Oligonukleosomen die Notwendigkeit einer hohen Reproduzierbarkeit.

Nach Bellard et al. (1978) verschiebt sich das Ausmaß der Anreicherung bzw. Verarmung von transkriptionell aktiven Genen in Oligonukleosomen verschiedener Länge mit der Stärke des Verdau. Dabei wird der Gradient zwischen Anreicherung und Verarmung (d.h. der Unterschied im Anreicherungs faktor zwischen $n(i)$ und $n(i+1)$) mit zunehmenden Verdau steiler. Da die Anreicherung transkriptionell aktiver Gene auch die Anreicherung von Initiationsregionen bedeuten kann, wurde einige Sorgfalt auf die Konstanz der Verdaubedingungen, damit auch auf die Steilheit des Gengradienten, gelegt.

Abb. 5 zeigt, daß das beobachtete Nukleosomenmuster eine Folge des MN Abbaus war und nur zu einem kleinen Teil aus der Aktivität der endogenen, Ca- u. Mg- abhängigen Nuklease (Hewish u. Burgoyne, 1973) resultierte. In den Positionen der Nukleosomenpeaks machte die MN - freie Kontrolle (Kurve a) 11 - 12 % des E(260) Profiles aus, wie

es mit Nukleasezusatz erhalten worden war (Kurve b). Im Auftragebereich der Gradienten, wo sich niedermolekulares Material befindet (≤ 5 s), erreichte Kurve a) dagegen bis zu 40 % der E(260) von Kurve b). In diesem Bereich befinden sich nicht nur DNA Abbauprodukte, sondern sämtliche nicht - sedimentierenden Moleküle, die bei der Lyse der Kerne frei werden. Der Wert von 11 - 12 % erscheint daher als besseres Maß für die nukleolytische Aktivität der Endonukleasen.

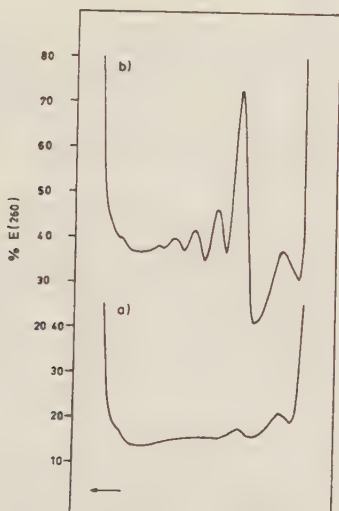


Abb. 5 Endogene Nukleaseaktivität bei Verdau von Ratten-leberzellkernen

Zellkerne wurden wie unter Methoden beschrieben mit und ohne Nukleasezusatz verdaut. Die Fraktionierung erfolgte auf 10 - 30 % Sucrosegradienten in 10 mM Tris (pH 8,0), 20 mM NaCl, 0,2 mM EDTA. Sedimentation in Pfeilrichtung.

a) endogene Aktivität
b) mit Nukleasezusatz
E(260) in SkT

Die E(260) im Zentrifugat nach einem Standardverdau betrug etwa 50 , das E(280)/E(260) Verhältnis war 0,585/0,005 (Mittelwert und SD aus 10 Aufarbeitungen), die Säurelöslichkeit unter Berücksichtigung der Hyperchromizität der säurelöslichen DNA lag bei 7 - 9 % (s. II,2.2.3) .

2.3 Fraktionierung von Nukleosomen

2.3.1 Sucrosegradientenzentrifugation

Sucrosegradientenzentrifugation zur Trennung von Oligonukleosomen wurde von M. Noll bereits 1974 verwendet (Noll, 1974). Die Wahl der in der vorliegenden Arbeit im Gradienten verwendeten Salzbedingungen (50 mM Natriumphosphat, 160 mM AS, 0,2 mM EDTA) basierte auf der Untersuchung von Sahasrabudde u. Saunders (1977) über die Turbidität (als Maß für die Löslichkeit) von Mono- und Oligonukleosomen in Abhängigkeit von der Ionenstärke. Dabei wiesen Nukleosomen etwa das gleiche Löslichkeitsprofil auf, das von Chromatin schon lange bekannt war : hohe Löslichkeit bei geringen und hohen Ionenstärken, geringe Löslichkeit zwischen 10 und 160 mM AS. Die Autoren zeigten weiter, daß bei einer gegebenen Ionenstärke die Turbidität linear von der Nukleosomenkonzentration abhing. Die Ionenstärke wurde daher für die Standardpräparationsmethode gerade so hoch gewählt, daß die unter Verdaubedingungen auftretenden Nukleosomenkonzentrationen in Lösung blieben, es aber noch nicht zu einer Entfernung von H1 kam. Dagegen werden unter den Bedingungen eine Reihe von ionisch gebundenen NHCP entfernt (Sonnenbichler et al., 1977; Bidney u. Reeck, 1978), was aber erwünscht war : die Transkription an Nukleosomen sollte weitgehend ohne den Einfluß zusätzlicher Faktoren untersucht werden.

Abb. 4 gibt zwei Fraktionierungsbeispiele unter den oben genannten Salzbedingungen (15 - 30 % Sucrosegradient).

Neben der Trennung bei hoher Ionenstärke (s.o.) sollte nach Sahasrabudde u. Saunders (1977) auch die Trennung bei niedriger Ionenstärke möglich sein.

In einer Reihe von Versuchen wurden Ionenstärken zwischen 5 und 20 mM untersucht. Abb. 5 zeigt, daß die Auftrennung in peaks etwas schlechter war (i.A. wurden Nukleosomen mit $i > 5$ nicht mehr aufgelöst).

In allen Fällen bildete sich jedoch während der Zentrifugation bei niedriger Ionenstärke ein pellet aus. Aus anderen Versuchen konnte geschlossen werden, daß Mononukleosomen diesen Niederschlag bildeten : bei der Dialyse von Nukleosomenfraktionen, die durch Zentrifugation bei hoher Ionenstärke erhalten worden waren, gegen 0,2 mM EDTA bildete sich eine Trübung nur bei Mononukleosomen aus. Eine Elektrophorese der DNA aus Überstand und pellet ergab für beide Fraktionen Mononukleosomenlänge.

Sanders u. Hsu (1977) fanden bei der Dialyse von H1 - freien Mononukleosomen aus 0,6 M NaCl gegen Wasser, daß 30 % der Nukleosomen ausfielen. Die Fällung fand nur in Gegenwart von zweiwertigen Kationen, nicht aber in 10 mM EDTA statt. Die DNA Längen in Überstand und Niederschlag waren ebenfalls gleich. Unterschiede existierten im NHCP- und H3 Gehalt. Die Abwesenheit von H1 mag in diesem Fall die Gegenwart von zweiwertigen Kationen erfordert haben.

Finch u. Klug (1976) dagegen beschreiben, in Einklang mit meinen Ergebnissen, die Aggregation H1-haltiger Mononukleo-

somen bei einfacher Dialyse gegen Wasser.

Nach Olins et al. (1976) können Mononukleosomen, die in 0,2 mM EDTA löslich sind zusätzlich durch 150 mM KCl in zwei gleich große Populationen mit und ohne H1 fraktioniert werden. Eine fraktionierte Elution von n(1) aus Zellkernen wurde von Sanders (1978) beschrieben.

Neuere Publikationen unterstreichen den Vorteil höherer Ionenstärken bei der Fraktionierung von Nukleosomen.

1) Strätling (1979) fand bei der Analyse von DNA Längen in peak Fraktionen von Sucrosegradienten, die unter unterschiedlichen Ionenbedingungen gefahren worden waren, daß zwischen 5 und 150 mM NaCl Oligonukleosomen aggregieren können. Ein peak in der Lage von Trinukleosomen war unter diesen Bedingungen somit nicht nur aus n(3), sondern auch aus n(1) + n(2) zusammengesetzt usw. (s.a. Lohr u. Ide, 1979).

2) Levinger u. Carter (1979) fanden, daß in Abwesenheit von Ca und bei niedriger Ionenstärke MN fest an Nukleosomen bindet. Mit zunehmender Salzkonzentration ließ sich das Enzym aber frei im 5 s Bereich des Gradienten nachweisen.

Mitisolierte MN bildet in Transkriptionsexperimenten mit Oligonukleosomen einen doppelten Störfaktor :

a) es kann zu einem Selbstverdau der eingesetzten Nukleosomen kommen (Carter u. Levinger, 1977)

b) MN hat auch RNase Aktivität (Anfinsen et al., 1963)

Neben der Ionenstärke wurden in Fraktionierungsversuchen auch andere Parameter wie Position, Art und Steilheit des Sucrosegradienten, Zentrifugationsvolumen und Zentrifugationsart untersucht.

Während der Übergang vom 10 - 30 % zum 15 - 30 % Sucrosegradienten eine Verbesserung in der Auflösung brachte, bedeutete die Verkürzung des Gradienten auf 20 - 30 % eine deutliche Stauchung und Verschlechterung der Auflösung.

Abb. 6 vergleicht 15 - 30 % und 20 - 30 % Sucrosegradienten bei einem relativ extensiven Verdau.

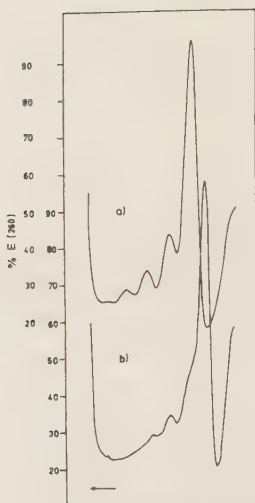


Abb. 6 Trennung von Oligonukleosomen auf 15 - 30 % und 20 - 30 % Sucrosegradienten

Rattenleberzellkerne wurden unter Standardbedingungen, aber mit 500 u MN 5 min bei 37 °C verdaut. Die Sucrosegradienten waren in 10 mM Tris (8,0), 20 mM NaCl, 0,2 mM EDTA. Sedimentation in Pfeilrichtung.

a) 15 - 30 % Sucrose

b) 20 - 30 % Sucrose

Lineare und isokinetische Gradienten (H. Noll, 1967) unterschieden sich nur unwesentlich, weshalb die einfacheren linearen Gradienten beibehalten wurden.

Die Zentrifugation mit einem größeren Gradientenvolumen wurde untersucht, um in einem Lauf höhere Ausbeuten an Nukleosomen zu erhalten (eine stärkere Beladung der Standardgradienten führte zu einer Verschlechterung der Trennung). Abb. 7 zeigt

daß die Auflösung bei etwa dreifachem Gradientenvolumen (36 vs. 12,5 ml unter Standardbedingungen) stark verschlechtert war. Außerdem bereitete die Abnahme des größeren Gradienten durch Verdrängen mit einer dichten Sucroselösung technische Schwierigkeiten.

Versuche mit Vertikalrotoren waren ebenfalls nicht zufriedenstellend.

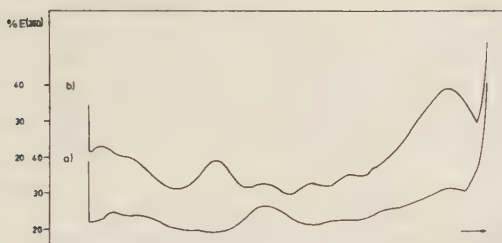


Abb. 7 Trennung von Oligonukleosomen auf hochvolumigen Gradienten

2,5 x 10⁹ Rattenleberzellkerne in 10 mM Tris (8,0), 20 mM NaCl, 0,2 mM EDTA, 2,5 x 10⁻⁵ M Calciumchlorid und 2,5 % Sucrose wurden bei 37 °C 3 min mit 730 u MN verdaut. Nach Stoppen und Zentrifugieren (s. II,2.1.3) wurde je 1/4 des Überstandes auf lineare 5 - 30 % Sucrosegradienten (Vol = 36 ml) aufgetragen. Sedimentation in Pfeilrichtung.

a) in 10 mM Tris (8,0), 20 mM NaCl, 0,2 mM EDTA

b) in 50 mM Natriumphosphat, 160 mM AS, 0,2 mM EDTA (7,0)
Zentrifugation erfolgte in einem Kontron SW 28 Rotor bei 4 °C, 28000 rpm für 14,5 h. Das E(260) Profil ist gezeigt.

Nukleosomen gleicher Kettenlänge wurden nach der Fraktionierung gepoolt und ausgiebig gegen 0,2 mM EDTA, 1 mM NaCl, pH 7,0 dialysiert. Sucrosefreie Lösungen waren notwendig, um eine Stimulierung der Transkription durch Sucrose auszuschließen (Buss u. Stalter, 1978) wie auch um eine fehlerfreie DNA Bestimmung mit DABA (s. II,2.2.2) zu ermöglichen.

Für Transkriptionsversuche wurden Nukleosomen möglichst frisch verwendet. In Experimenten, in denen Nukleosomenlösungen verwendet wurden, die bei -30 °C gelagert worden waren, konnte kein Einfluß des Einfrierens auf das Transkriptionsverhalten festgestellt werden. Olins et al. (1976) konnten an Mononukleosomen mit einer Reihe von physikalisch-chemischen Methoden ebenfalls keine Veränderung der Struktur durch Einfrieren und Auftauen feststellen.

2.3.2 Gelpermeationschromatographie

Neben der Sucrosegradientenzentrifugation, die eine Auftrennung verschiedener Oligonukleosomen ermöglichte, wurde insbesondere zur Darstellung größerer Mengen an Mononukleosomen und core Partikeln auch die Gelpermeationschromatographie (GPC) untersucht.

Die Gelpermeationschromatographie ermöglicht die Trennung von Partikeln, die sich in ihrem hydrodynamischen Volumen unterscheiden, wobei die Trennschärfe, wegen der im Lauf

erfolgenden starken Verdünnung der aufgetragenen Lösung, deutlich unter der der Sucrosegradientenzentrifugation liegt. Ferner verhält sich die Matrix gegenüber dem zu fraktionierenden Material häufig nicht vollständig inert, was zu chromatographischen Nebeneffekten führt, die, wenn eine Trennung rein nach der Größe der Partikel beabsichtigt ist, unerwünscht sind. Solche effekte sind insbesondere für Nukleinsäuren bekannt (z.B. Petrovic et al., 1974; Holmes et al., 1975).

Im vorliegenden Abschnitt wird die Anwendung der GPC zur Abtrennung von H1 von langen Chromatinfragmenten ("long chromatin") auf Sepharose Cl 4B bei hoher Ionenstärke, sowie zur Isolierung von Mononukleosomen und core Partikeln aus Chromatinverdaus auf Sepharose 6 B und Biogel A 5m beschrieben.

2.3.3 .1 DNP - H1 Trennung auf Sepharose Cl 4B

Die Darstellung von core Partikeln wird erleichtert durch die vorherige Abtrennung von H1, da dieses dann die internukleosomalen spacer nicht mehr vor Abbau durch MN schützen kann (Lutter, 1978). Da auf die Intaktheit der spacer Längen für diesen Zweck nicht geachtet werden muß, kann H1 am einfachsten durch hohe Ionenstärke von Chromatin abgelöst und wegen des Größenunterschiedes von den Chromatinfragmenten abgetrennt werden.

Um eine möglichst saubere Trennung zu bekommen, wird von großen, durch Nukleaseabbau erhaltenen Chromatinfragmenten ausgegangen.

Abb. 8 zeigt das E(260) Profil einer solchen Trennung. Die Sauberkeit der H1 Abtrennung wurde mit SDS Elektrophorese untersucht. Vermessen der gefärbten Gele zeigte, daß H1 in den Fraktionen 11 - 19 maximal 2 % des Histongehaltes ausmachte.

H1 konnte so schnell (in weniger als 2 h) und reproduzierbar von long chromatin abgetrennt werden.

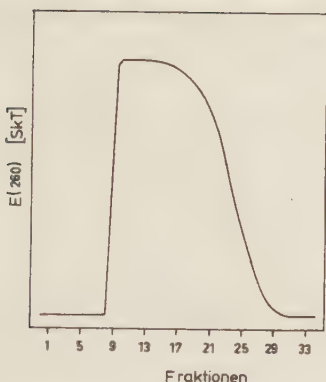


Abb. 8 Long Chromatin auf Sepharose Cl 4B. E(260) Profil

CT Kerne wurden wie unter Methoden beschrieben isoliert. 1215 E(260) Einheiten wurden bei 135 E(260)/ml 4 min bei 37 °C in Hewish - Burgoyne Puffer + 1 mM Calciumchlorid mit 1000 u MN verdaut. Die Reaktion wurde durch EDTA Zugabe ad 4 mM beendet. Die resultierende Suspension wurde 10 min bei 6000 rpm in einer Christ Minifuge abzentrifugiert, wobei etwa 10 % der eingesetzten E(260) im Überstand verblieben. Das pellet löste sich in 10 ml 0,2 mM EDTA (pH 7,0) zu einer stark seidig glänzenden Lösung. Nach nochmaliger Zentrifugation (5 min Minifuge, 6000 rpm) wurde der Überstand mit 4,5 M NaCl tropfenweise auf 0,63 M gebracht, wobei die anfänglich auftretende Trübung gegen Ende wieder verschwand. Dieses Material wurde auf eine Sepharose Cl 4B Säule aufgetragen (3 x 30 cm, Vol = 212 ml, äquilibriert mit 0,2 mM EDTA, 10 mM Borat, pH 9,0 , 0,2 mM 2-ME; 7,15 ml/Fraktion, Laufgeschwindigkeit, hydrostatisch, 2 ml/min).

2.3.4 .2 Isolierung von Mononukleosomen und Core Partikeln auf Sepharose 6B und Biogel A 5m

Abb. 9 vergleicht die Fähigkeit von Sepharose 6B unter zwei verschiedenen ionischen Bedingungen, aber ähnlicher (relativ hoher) Laufgeschwindigkeit Verdaus von long chromatin aufzutrennen.

Die beiden Puffersysteme, 5 mM Tris (pH 7,5) (Abb. 9a) und 100 mM Borat (pH 9,0) (Abb. 9b) ergaben eine ähnliche Auftrennung. Die unterschiedlichen Profile sind durch den unterschiedlichen Verdaugrad bedingt. DNA Gele zeigten, daß die Auftrennung von core Partikeln und der ebenfalls während des Verdaus entstandenen "spacerless Dinukleosomen" (Lutter, 1978; Steinmetz et al., 1978) unter beiden Chromatographiebedingungen nicht zufriedenstellend war.

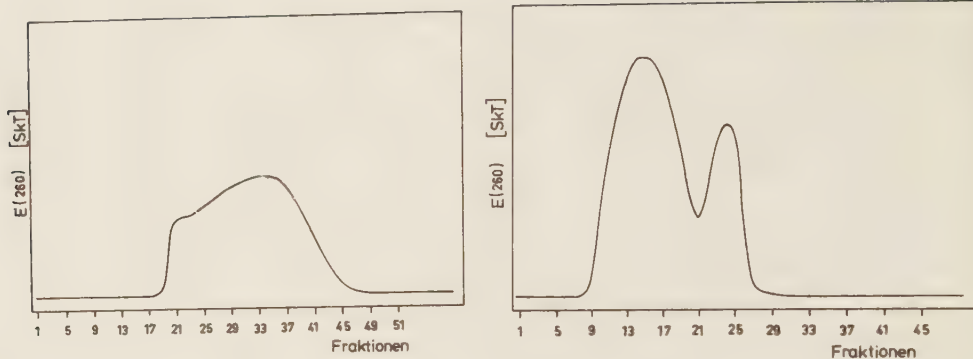


Abb. 9 Partialverdaus von H1 - freiem long chromatin .
Chromatographie auf Sepharose 6B

Abb. 9a) Long chromatin wurde H1 - frei hergestellt wie in Abb. 8 beschrieben. Nach Dialyse gegen 5 mM Tris (pH 7,5), 0,2 mM EDTA, 0,2 mM 2-ME wurde die Lösung in einer Minicon Apparatur über einer PM 30 Membran (Fa. Amicon, Oosterhout, Niederlande) druckkonzentriert (Konzentrierung teilweise auch durch Dialyse gegen eine 50 % Lösung von PEG 6000 im obigen Puffer). 1 ml Konzentrat (75 E(260) Einheiten wurde mit 2,5 mM Ca und 200 u MN 30 min bei 37 °C verdaut. Nach Stop durch Zugabe von EDTA ad 5 mM wurde die Lösung auf eine Sepharose 6B Säule aufgetragen (Äquilibriumspuffer s.o., 3 x 28 cm, Vol = 200 ml, Laufgeschwindigkeit, hydrostatisch, 2,24 ml/min). Gezeigt ist das E(260) Profil.

Abb. 9b) Long chromatin wurde H1 - frei hergestellt wie in der Legende zu Abb. 8 beschrieben. Nach Dialyse gegen 100 mM Borat (pH 9,0) wurde wie angegeben bis auf 50 E(260)/ml konzentriert. 4,6 ml Konzentrat wurden bei 2,5 mM Ca mit 120 u/ml MN 5 min bei 37 °C verdaut. Nach Stop mit EDTA wurde auf die oben beschriebene Sepharose 6B Säule aufgetragen, die mit 100 mM Borat (9,0) äquilibriert war. (7,15 ml/Fraktion, 2,15 ml/min):

Es wurde daher versucht mit anderen Säulendimensionen, wesentlich reduzierten Flußgeschwindigkeiten und einer anderen Gelmatrix die Auflösung zwischen core Partikeln und spacerless n(2) zu verbessern.

Um den Einfluß der Gelmatrix direkt sehen zu können, wurde eine Biogel A 5m und eine Sepharose 6B Säule gleichzeitig mit gleichen Teilen einer Lösung beladen und über zwei Kanäle einer peristaltischen Pumpe abgepumpt. Abb. 10a) und b) zeigen das E(260) Profil der beiden parallelen Säulenläufe. Die Effizienz der Auftrennung wurde über eine Analyse

der DNA Längen bestimmt. Das Maximum der core Partikel Bande lag bei etwa 150 bp, das der Dinukleosomenbande bei 280 bp. Reine core Partikel lagen auf beiden Säulen ab Fraktion 35 vor.

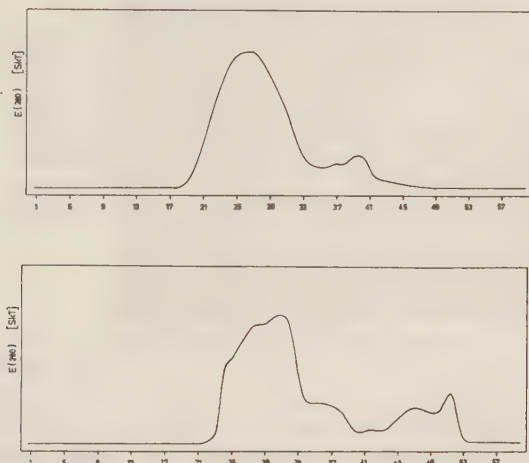


Abb. 10 Vergleichende DNP Fraktionierung auf Sepharose 6B und Biogel A 5m

H1 - freies long chromatin wurde hergestellt wie in der Legende zu Abb. 8 beschrieben. Der pool wurde gegen 10 mM Borat (9,0), 0,2 mM EDTA dialysiert und über eine Amicon PM 30 Membran bis zu einer E(260) von 50 druckkonzentriert. Die Lösung wurde 2,5 mM an Calciumchlorid gemacht und 5 min bei 37 °C mit 50 u/ml MN verdaut. Die Reaktion wurde gestoppt durch Zugabe von 200 mM EDTA ad 4 mM. Beide Säulen liefen in 100 mM Borat (9,0).

- a) Sepharose 6B, 2,3 x 90 cm, Vol = 374 ml, 9,3 ml/Fraktion, 0,63 ml/min, Auftragevolumen = 7 ml
- b) Biogel A 5m, 2,1 x 140 cm, Vol = 485 ml, 9,3 ml/Fraktion, 0,49 ml/min, Auftragevolumen = 7 ml

Über die Natur der peaks zwischen Fraktion 35 und 53 auf Biogel A 5m kann hier nur spekuliert werden. Gelelektrophoresen zeigten, daß die Menge an core Partikel DNA in diesem Bereich mit wachsender Fraktionsnummer stetig abnahm. Zusätzlich trat DNA subnukleosomaler Länge (< 150 bp) auf, die mit zunehmendem Elutionsvolumen immer kürzer wurde. Es ist wahrscheinlich, daß der peak bei Fraktion 51 Mono- und Oligonukleotide enthält.

Inwieweit die peaks bei Fraktion 42 und 47 diskrete subnukleosomale DNP Partikel darstellen, wie sie von

mehreren Gruppen beschrieben worden sind (z.B. Bakayev et al., 1977; Nelson et al., 1977) kann ohne weitere Analyse nicht gesagt werden.

Das unterschiedliche Fraktionierungsverhalten gleicher Proben auf Sepharose 6B und Biogel A 5m, die beide aus 6 % Agarose bestehen und nach Angaben der Hersteller einen etwa gleichen Trennungsbereich aufweisen ($10(4) - 4 \times 10(6)$ bzw. $10(4) - 5 \times 10(6)$ kD für globuläre Proteine) bleibt überraschend. Starke chromatographische Wechselwirkungen können ausgeschlossen werden, da in beiden Fällen die Elution innerhalb eines Säulenvolumens stattfand.

Die Versuche zeigen, daß eine Isolierung von core Partikeln durch GPC möglich ist.

2.4 Charakterisierung von Nukleosomen

Nukleosomen, insbesondere Mononukleosomen und core Partikel, sind in der Vergangenheit mit physikalisch-chemischen und biochemischen Methoden ausführlich untersucht worden. Die vorliegende Arbeit folgte keiner strukturellen Zielsetzung, weshalb für Informationen zur Struktur hier nur auf die in der Einführung zitierte Literatur verwiesen wird. Eigene Versuche zur Charakterisierung der Nukleosomen wurden aus Kontrollgründen durchgeführt. Die Einheitlichkeit verschiedener Nukleosomenfraktionen wurde durch DNA Elektrophorese bestimmt. Mit elektronenmikroskopischen Methoden sollte die für Transkriptionsuntersuchungen entscheidende Frage nach der Verunreinigung von Nukleosomenpräparationen mit nackter DNA beantwortet werden. Die Histon- und NHCP Stöchiometrie von Oligonukleosomen, die nach der hier beschriebenen Methode (s. II, 2.1.3) hergestellt worden waren, ist von Kittlaus (1980) eingehend untersucht worden.

2.4.1 Analyse nukleosomaler DNA Längen

Abb. 11 zeigt aus Nukleosomen extrahierte DNA Fragmente nach Auftrennung in einer Elektrophorese unter nicht-denaturierenden Bedingungen. Die gegenseitige Kontamination von Nukleosomen verschiedener Kettenlänge war bedingt durch das Präparationsverfahren : mehrere Fraktionen aus verschiedenen Sucrosegradienten wurden zu pools zusammengefaßt, wobei eine leichte Überschneidung verschiedener Kettenlängen zugunsten der Ausbeute toleriert wurde. Wurden nur peak Fraktionen analysiert, war die Heterogenität wesentlich reduziert. Den einzelnen Banden konnte in einer halblogarithmischen Auftragung der DNA Längen von Restriktionsfragmenten gegen die Laufstrecken, DNA Längen zugeordnet werden. Die Division der DNA Längen durch den Längenindex i ergab einen Näherungswert für die "repeat Länge" (die Länge der mit der mononukleosomalen Grundeinheit verbundenen DNA). Aus den 8 Banden wurde ein mittlerer Wert der repeat Länge von 212 bp (SD = 9) bestimmt. Noll und Kornberg (1977) ermittelten in einer eingehenderen Untersuchung einen Wert von 198/6 bp.

Die Ergebnisse stimmen innerhalb der Standardabweichung überein.

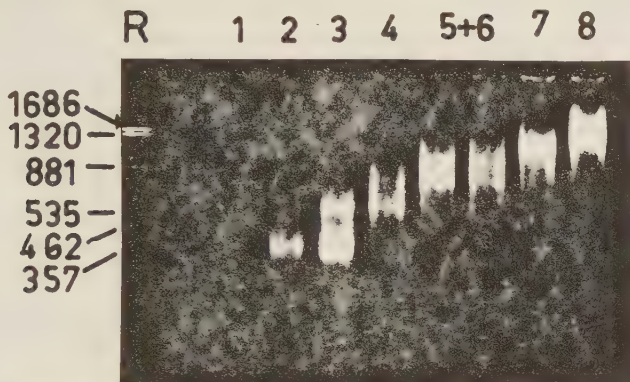


Abb. 11 Elektrophoretische Längenbestimmung nukleosomaler DNA

DNA wurde aus gepoolten Oligonukleosomenfraktionen extrahiert (s. II,2.1.9) und in einem 3,5 % PAA Gel unter nicht denaturierenden Bedingungen elektrophoretisiert (s. II,2.3.3). In der Spalte R wurden λ dv(1)/Bsp Restriktionsfragmente aufgetragen (Streeck u. Zachau, 1978).

2.4.2 Elektronenmikroskopie

Polymerase B transkribierte Oligonukleosomen weniger effektiv als die daraus extrahierte DNA (s. IIIB,2.2). Eine einfache, wiewohl durch die hier vorgelegten Ergebnisse unwahrscheinliche (s. Zusammenfassung), Erklärung dieses Befundes besteht darin, anzunehmen, daß Präparationen von Nukleosomen einen Anteil nackter DNA enthalten und daß nur diese nackte DNA und nicht Nukleosomen transkribiert werden. Lilley et al. (1979) versuchten das Transkriptionsverhalten hochverdünnter Mononukleosomenlösungen auf diese Weise zu erklären.

Zur elektronenmikroskopischen Klärung der Frage genügt es nicht, Präparate von Nukleosomen unter dem Mikroskop zu betrachten. Es kann nämlich zunächst nicht ausgeschlossen werden, daß sich Oligonukleosomen und nackte DNA in der Effizienz mit der sie während der elektronenmikroskopischen Präparationsmethode auf dem grid zurückgehalten werden, unterscheiden. Um diese Komplikation auszuschalten, wurde wie folgt verfahren:

Für verschiedene elektronenmikroskopischen Präparate wurden zu einer konstanten Menge an Nukleosomen zunehmende Mengen nackter DNA gleicher Länge hinzugegeben. Zur Beweisführung wurde angenommen (der Gegenbeweis war zu erbringen), daß die Nukleosomenpräparation n(i)', von der ausgegangen wurde,

einen gewissen Anteil nackter DNA $D(u)$ enthielt. Die Zahl diese DNA Moleküle sollte dabei über den Faktor $k(u)$ proportional zur Zahl $n(i)'$ sein.

(Zur mathematischen Vereinfachung wird hier angenommen, daß die kontaminierenden DNA Moleküle die gleiche Länge wie die Nukleosomen haben. Dadurch wird es möglich, die im Experiment vorgegebenen Werte, sc. die DNA Konzentrationen $n(i)'$ und $D(i)$ wie Molekülzahlen zu behandeln. Ferner wird zunächst angenommen, daß $n(i)$ und $D(i)$ ohne selektiven Verlust für die EM präpariert werden können. Die Annahme etwa gleicher DNA Länge wurde durch den elektronenmikroskopischen Befund gerechtfertigt. Dagegen zeigte die Auswertung der Photographien, einen präferentiellen DNA Verlust während der Präparation, der aber weder den Formalismus noch das Ergebnis beeinflußt.)

Bei einem bestimmten Eingabeverhältnis x beträgt das tatsächliche Verhältnis von Nukleosomen zu DNA in der Lösung y , wobei

$$D = D(i) + D(u)$$

Die Elektronenmikroskopie ermöglicht in einem winzigen Bruchteil der Lösung, durch Auszählen der Moleküle, die Bestimmung dieses Wertes y . y -Werte wurden bei verschiedenen Eingabeverhältnissen x und mit verschiedenen Nukleosomenchargen bestimmt.

Mit den folgenden Gleichungen wird ein Zusammenhang zwischen dem Eingabewert x und der Meßgröße y hergestellt. Mit Hilfe der letzten Gleichung ließen sich Modellkurven für verschiedene Anteile an nackter DNA in Nukleosomenpräparationen berechnen.

$$x(D_i) = \frac{D_i}{n_i'}$$

$$y(D_i) = \frac{D}{n_i}$$

$$D_u = k_u n_i'$$

$$x(D_i) = \frac{D_i}{k_u n_i' + (1-k_u) n_i'}$$

$$D_i = x(D_i) (k_u n_i' + (1-k_u) n_i')$$

$$y(D_i) = \frac{D_i + k_u n_i'}{(1-k_u) n_i'}$$

$$D_i = y(D_i) (1-k_u) n_i' - k_u n_i'$$

$$x(kn' + (1-k)n') = y(1-k)n' - kn'$$

$$y = x \frac{kn' + (1-k)n'}{(1-k)n'} + \frac{kn'}{(1-k)n'}$$

$$y = \frac{k}{1-k} + \frac{1}{1-k} x$$

In Abb. 12 sind sowohl experimentelle Werte von x und y , wie auch die theoretische Kurve für eine 10 % Kontamination von Nukleosomen mit nackter DNA wiedergegeben. Da DNA Kontaminationen sowohl die Steigung wie den Achsenabschnitt beein-

flussen, lassen sie sich mit der geschilderten Analysenmethode relativ empfindlich nachweisen. Bei einer graphischen Auswertung der Daten liegt die Nachweisempfindlichkeit bei etwa 2 % nackter DNA. Zur Erstellung der experimentellen Punkte in Abb. 12 wurden rund 16000 Objekte auf 100 Photographien gezählt. Abb. 13 zeigt eine solche Aufnahme.

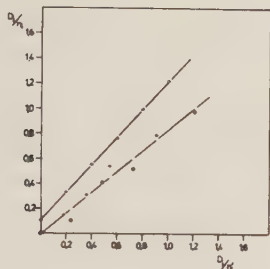


Abb. 12 Elektronenmikroskopische Bestimmung der Kontamination von Nukleosomen mit nackter DNA

n(7) in 5 mM TEA, 10 mM Ammoniumchlorid, 0,2 mM EDTA, pH 7,9 (○), bzw. n(6) in 5 mM Tris, 20 mM Ammoniumchlorid, pH 7,9 (+) wurden mit Glutaraldehyd vernetzt und danach mit unterschiedlichen Konzentrationen von D(7) bzw. D(6) für die Elektronenmikroskopie präpariert (s. II,2.7). Auf den EM Aufnahmen wurden Nukleosomen und DNA Moleküle ausgezählt. Daraus wurde y berechnet. Die Kurve (Δ) wurde für einen angenommenen DNA Gehalt von 10 % ($k = 0,1$) berechnet.

0 Die elektronenmikroskopischen Arbeiten wurden im EMBO Laboratorium in Heidelberg mit Drs. Michael Groom und Jacques Dubochet durchgeführt. Die Auswertung der Photographien besorgte Gudrun Wolf.

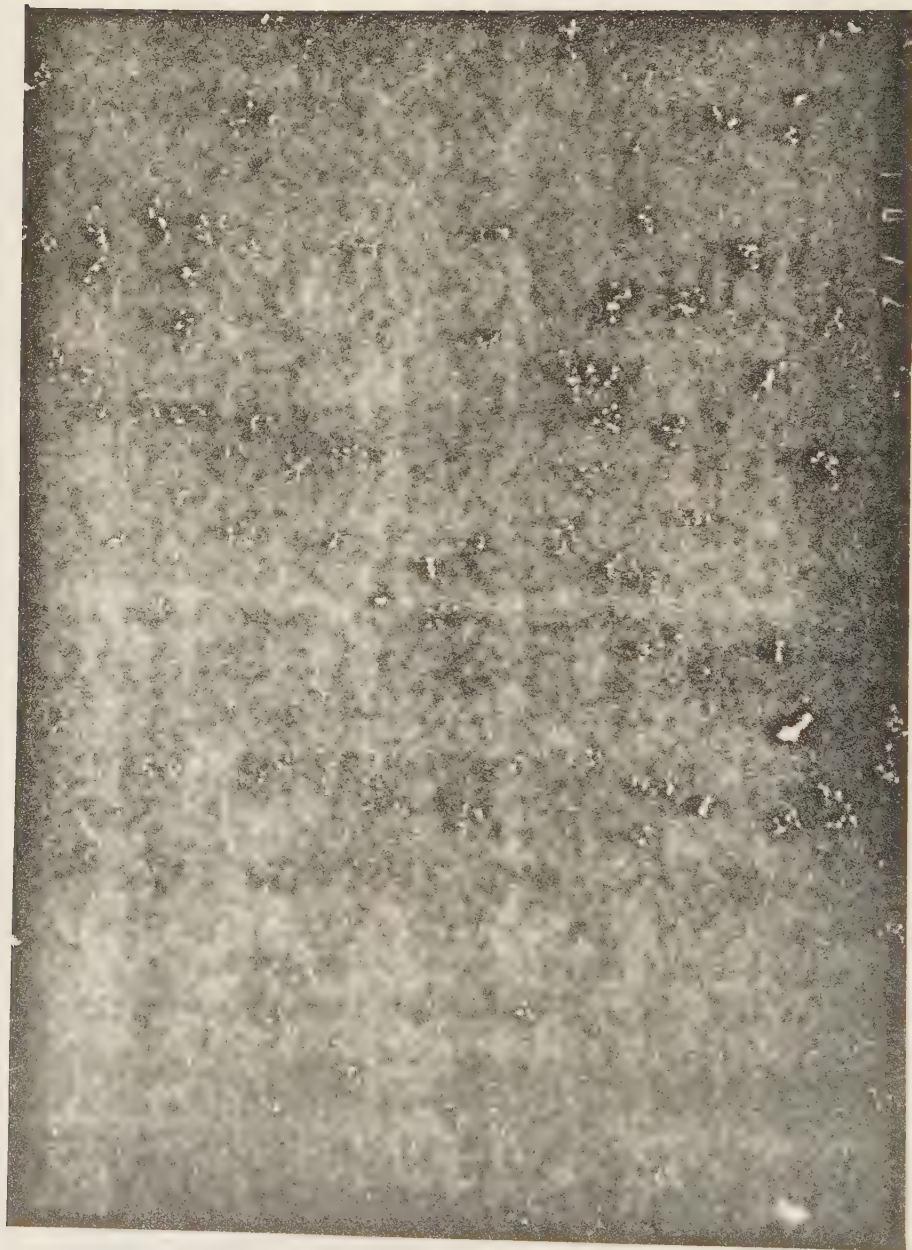


Abb. 13 Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Gemisches aus Nukleosomen und nackter DNA

D(7) und n(7) bei $x = 0,3$ wurden wie unter Methode beschrieben für die EM präpariert. Vergrößerung 40000-fach.

3. Isolierung und Charakterisierung von RNA Polymerase B aus Rattenleber

3.1 Einführung

Seit den ersten Versuchen von Weiss im Jahr 1960, DNA - abhängige RNA Polymerase aus Zellkernen zu isolieren (Weiss, 1960), vergingen etwa 10 Jahre , in denen es nicht gelang, die Enzymaktivität in befriedigenden Ausbeuten frei von DNA oder Chromatin zu gewinnen. Jacob et al. (1970) beschreiben frühe Versuche, freies Enzym zu erhalten. Erst 10 Jahre später, basierend auf der Arbeit von Röder und Rutter (1969), wurden RNA Polymerasen in ausreichenden Mengen und hoher Reinheit für strukturelle und funktionelle Untersuchungen zugänglich.

Zur Unterscheidung der eukaryontischen RNA Polymerasen A, B und C (oder I, II und III) auf grund ihrer unterschiedlichen Empfindlichkeit gegen den Inhibitor α -Amanitin, bzw. ihres unterschiedlichen chromatographischen Verhaltens, sowie zu Vorkommen und allgemeinen Eigenschaften sei hier nur auf reviews verwiesen (Chambon, 1975; Roeder, 1976) Die praktische Unterscheidung mit α -Amanitin ist weiter unten beschrieben.

Die Reinigung von Polymerase B aus Rattenleber wurde beschrieben von Weaver, Blatti und Rutter (1971), Mandel u. Chambon (1971), Chesterton u. Butterworth (1971) sowie Seifart, Benecke und Juhasz (1972). Bei meinen anfänglichen Versuchen , diese Vorschriften mit geringen Mengen an Ausgangsmaterial zu reproduzieren (35 vs. 400 - 1500 g Rattenleber) erwiesen sich diese als störanfällig. Es wurde daher versucht, systematisch eine Reinigung aufzubauen, die relativ unabhängig vom Durchführungsmaßstab, schnell und reproduzierbar das Enzym in sauberer Form lieferte.

Im folgenden werden Versuche beschrieben, die zum Aufbau der Reinigung in der publizierten Form führten (Pflugfelder u. Sonnenbichler, 1978) . Die Darstellung gliedert sich, dem Gang der Reinigung folgend, in drei Abschnitte : Extraktion der Enzyme aus dem Zellkern, Fällungsschritte und Chromatographien.

RNA Polymerase Aktivitäten wurden nachgewiesen durch ihre Fähigkeit, radioaktive Triphosphate in säurefällbare RNA einzubauen (s. II, 2.4.1). Um die drei eukaryontischen RNA Polymerasen A, B und C zu unterscheiden, wurden die Tests mit 0, 2 und 150 $\mu\text{g/ml}$ Amanitin durchgeführt. Der Test mit 0 $\mu\text{g/ml}$ erfaßt alle drei RNA Polymerasen, der mit 2 $\mu\text{g/ml}$ die Polymerasen A und C, der mit 150 $\mu\text{g/ml}$ nur noch die Polymerase A. Als 1 Enzymeinheit (unit) ist diejenige Enzymmenge definiert, die bei 37 °C in 10 min 1 nMol UMP in

säurefällbare RNA inkorporiert.

3.2 Extraktion der RNA Polymerasen aus den Zellkernen

3.2.1 Einfluß der Ionenstärke

In der Literatur sind im wesentlichen zwei Methoden zur Solubilisierung von RNA Polymerasen beschrieben: Homogenisierung der Zellkerne bei geringer (< 100 mM, z.B. Jacob et al. 1971) sowie Beschallen bei hoher Ionenstärke (z.B. 0,3 M Ammoniumsulfat, Röder u. Rutter, 1969). Die Enzyme sind bei niedriger Ionenstärke labil. Die Extraktion bei 0,3 M Ammoniumsulfat (AS) vermeidet diesen Zustand und ist vielfach mit Erfolg angewandt worden. Sie ist auch die Grundlage der vorliegenden Aufarbeitungsmethode.

In 5,4 ml einer Kernsuspension ($2,5 \times 10^6$ Kerne) wurde die Ionenstärke durch Zugabe von 0,6 ml von 3 M AS erhöht. Nach Beschallen wurde ein Aliquot entnommen und darin die Leitfähigkeit gemessen. Sie betrug nur ein Drittel des für 0,3 M AS erwarteten Wertes. Offensichtlich werden freie Valenzen, die durch das Brechen der ionischen Protein - Nukleinsäure Wechselwirkungen entstehen (teilweise) durch AS gesättigt (vgl. Record et al., 1976). Um die effektive I zu erhöhen wurde in späteren Versuchen zusätzlich mit 6 ml 0,3 M AS verdünnt wobei die gemessene Leitfähigkeit auf die von 240 mM AS stieg. Die Ausbeute an RNA Polymerase erhöhte sich dadurch.

3.2.2 Einfluß der Beschalldauer

Die Beschalldauer wirkte sich unterschiedlich auf die meßbare RNA Polymerase Aktivität aus, je nachdem ob direkt im Beschallansatz gemessen wurde, oder erst nach Verdünnen des Ansatzes. Bei der Verdünnung fällt Chromatin aus und nur die nicht im Transkriptionskomplex gebundene Polymerase bleibt im Überstand. Wird das Homogenat vor dem Verdünnen und Abzentrifugieren des Chromatins mit exogener DNA getestet, so werden freie und gebundene RNA Polymerasen zusammen erfaßt.

Abb. 14 zeigt die Aktivität direkt nach der Beschallung der Kernsuspension. Vor und nach AS - Zugabe und nach 3 Beschallzeiten wurden Aliquots entnommen und im Standardtestsystem mit und ohne exogene DNA gemessen. Zugabe von DNA zum Testsystem bewirkte eine etwa fünffache Steigerung der Transkription; d.h. ein beträchtlicher Teil der nukleären Polymerasen lag nicht im endogenen Transkriptionskomplex gebunden, sondern frei vor. Dieser Befund steht im Einklang mit Yu (1974), der nach Blockierung der endogenen Transkription mit Actinomycin D durch Zugabe von poly. d(A-T) eine dreifache Steigerung der UMP - Incorporation fand. Die template - gebundene Aktivität nahm während der Beschallung anfänglich zu, blieb dann aber konstant. Dagegen nahm die

freie Aktivität stetig ab. Eine anfängliche Stimulierung der endogenen Aktivität durch eine Zerstörung der template Integrität wurde auch von Pays und Ronsse (1973) beobachtet.

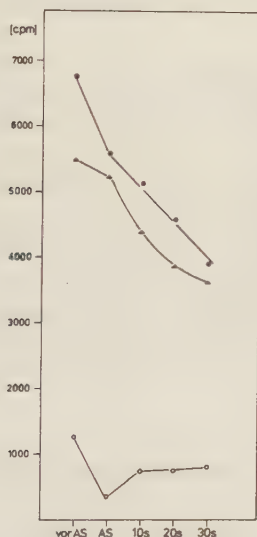


Abb. 14 Abhängigkeit der RNA Polymerase Aktivität von der Beschalldauer

Eine Kernsuspension (2×10^9 Kerne/ml) wurde in Puffer A(300) beschallt und Aliquots der Kernsuspension vor und nach AS - zugabe, sowie nach 10, 20 und 30 s Beschalldauer auf RNA Polymerase Aktivität getestet.

- — ○ Testmix ohne DNA (endogene Aktivität)
- — ● Testmix mit DNA
- △ — △ Differenz der Kurven b und a. (freie Aktivität)

Anders wirkte sich die Beschalldauer aus, wenn nach erfolgter Beschallung die Ionenstärke durch Verdünnen auf ein drittel reduziert, das ausfallende Chromatin abzentrifugiert und die RNA Polymerase Aktivität im Überstand (Chromatinzentrifugat) gemessen wurde. Tabelle 3 zeigt, wie die Aktivität im Überstand mit zunehmender Beschalldauer zunahm, bis sie etwa bei 25 s ein Plateau erreichte. Polymerase B zeigte eine deutlich höhere Aktivitätszunahme als Polymerase A.

Tabelle 3 Ausbeute von Polymerase A und B im Chromatinzentrifugat nach unterschiedlicher Beschalldauer

Beschalldauer (s)	0	5	15	25	35
Pol A (cpm)	108	280	--	369	30
Pol B (cpm)	56	247	380	1249	1064

Da die Ausbeute im Chromatinzentrifugat entscheidend war, wurden die Kernsuspensionen stets beschallt, obwohl die Ergebnisse in Abb. 14 zunächst nahelegten, diese Behandlung ganz zu vermeiden.

Spätere Versuche wurden bei höherer Leistungsabgabe des Sonifiers durchgeführt (3 A), so daß sich das Optimum der Beschalldauer auf 5 - 8 s reduzierte.

Bei Weaver et al. (1971), Mandel u. Chambon (1971), Chesterton u. Butterworth (1971) wird wesentlich länger sonifiziert (allerdings größere Mengen von Zellkernen und teilweise ohne genaue Leistungsangabe). Da Beschallen strukturelle und funktionelle Veränderungen bei RNA Polymerasen herbeiführen kann (Kellas et al. 1977) ist die Verkürzung der Prozedur in jedem Falle vorteilhaft.

3.3 Vorbereitung des Chromatinzentrifugates für chromatographische Folgeschritte

Chromatinfragmente unterschiedlicher Länge und Zusammensetzung weisen kein einheitliches Fällungsverhalten bei mittleren Ionenstärken auf (Olins et al. ,1976; Sahasrabudhe u. Saunders,1977; Sanders u. Hsu,1977). Das bedeutet, daß im Überstand nach Chromatinzentrifugation noch DNP (möglich auch RNA und RNP) enthalten sein kann. Ferner beobachteten Varshavsky et al. (1974) nackte DNA in Chromatinpräparationen. Auch diese würde bei einer Reduktion der Ionenstärke auf 100 mM AS in Lösung bleiben. In der Regel ist bei RNA Polymerase Reinigungen der erste chromatographische Schritt eine DEAE - Säule. Um reproduzierbare Säulenläufe zu bekommen ist es erforderlich, Polyanionen vorher quantitativ zu entfernen. Eine gebräuchliche Prozedur ist es, das Protein mit Ammoniumsulfat zu fällen und dadurch von den Polyanionen, die im Überstand bleiben, abzutrennen. Außerdem verringert sich dadurch das Auftragevolumen und damit die Auftragezeit.

Im folgenden werden verschiedene Fällungsmethoden diskutiert.

3.3.1 Ammoniumsulfatfällung

Aliquots aus einem Chromatinzentrifugat wurden zu unterschiedlichem Sättigungsgrad mit festem AS versetzt. Proteinkonzentration und RNA Polymerase Aktivität in Überstand und Niederschlag wurden bestimmt.

Abb. 15a) zeigt Polymeraseaktivitäten und Proteingehalt in Überstand und Niederschlag. In Abb. 15b) sind die Summen der Aktivitäten (bzw. Proteinmengen) aus Überstand und Niederschlag aufgetragen. In Abb. 15c) sind die Abnahme des Proteingehaltes bzw. der Polymeraseaktivität in % der Ausgangswerte wiedergegeben.

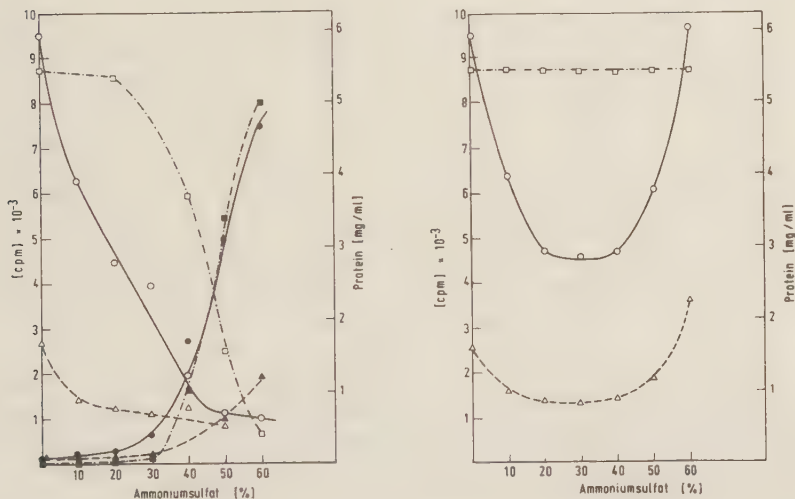


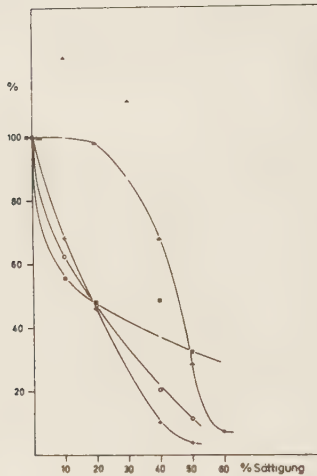
Abb. 15 Ammoniumsulfatfällung im Chromatinzentrifugat

a) 5 ml Aliquots eines Chromatinzentrifugates wurden mit festem AS gefällt (10 - 60 % Sättigung). Nach 210 min bei 4 C wurde abzentrifugiert (30 min, SW 40, 36000 rpm). Der Niederschlag wurde in 1 ml Puffer A aufgelöst und vor Entnahme der Testproben ebenfalls zentrifugiert (10 min, 25000 g). RNA Polymerase Aktivitäten wurden mit und ohne 2 ug/ml Ama getestet. Proteinbestimmung erfolgte mit der Biuretmethode. Die Angaben berücksichtigen das unterschiedliche Volumen von Überstand und Niederschlag.

- — ○ Akt. (cpm) 0 ug/ml Ama Überstand
- — ● Akt. (cpm) 0 ug/ml Ama Niederschlag
- △ — △ Akt. (cpm) 2 ug/ml Ama Überstand
- ▲ — ▲ Akt. (cpm) 2 ug/ml Ama Niederschlag
- — □ Protein (mg/ml) Überstand
- — ■ Protein (mg/ml) Niederschlag

b) Die Aktivitäten bzw. Proteinmengen aus Abb. 15a) von Überstand und Niederschlag sind als Summen aufgetragen.

- — ○ Akt. (cpm) 0 ug/ml Ama
- △ — △ Akt. (cpm) 2 ug/ml Ama
- — □ Protein (mg/ml)



c) Die Aktivitäten der Überstände aus Abb. 15a) sind umgerechnet auf Pol B und Pol (A + C); diese Aktivitäten, sowie der Proteingehalt sind ausgedrückt in Prozent der jeweiligen Ausgangswerte. (Chromatinzentrifugat)

- — ○ Gesamtaktivität
- — ■ Pol (A + C) (nicht gehemmt durch 2 ug/ml Ama)
- + — + Pol B (gehemmt durch 2 ug/ml Ama)
- △ — △ Protein

Abb. 15a) zeigt, daß die Polymeraseaktivität weitgehend vollständig gefällt und wieder aufgelöst werden konnte. Im gezeigten Beispiel ist die Fällung der Gesamtaktivität nicht vollständig, was vermutlich an einer nur partiellen Fällbarkeit von Pol (A + C) liegt. Möglicherweise liegt ein Teil dieser Enzyme in Form eines endogenen Transkriptionskomplexes vor, der wegen seines DNA - Anteiles nicht gefällt werden kann. Endogene Transkriptionskomplexe sind auch bei hohen Ionenstärken stabil und transkriptionell aktiv. Für Polymerase A ist dies von Butterworth et al. (1971) gezeigt worden.

Abb. 15c) zeigt, daß Pol B schneller gefällt wurde als das Gesamtprotein; beispielsweise sind bei 40 % AS 90 % des Enzyms, aber erst 32 % des Gesamtproteins gefällt. Von daher ließe sich eine etwa dreifache Anreicherung von Pol B durch AS - Fällung erwarten. Auch gegenüber Pol A sollte eine gewisse Anreicherung stattfinden.

Abschnitt 3.3.2 zeigt Gründe, die dies allerdings unmöglich machen.

3.3.2 Rattenleber enthält einen stimulierenden Faktor für Pol B

Abb. 15b) zeigt die Summen der Aktivitäten, sowie die Summen der Proteinmengen aus Überstand und Niederschlag für die einzelnen AS - Konzentrationen.

Die Proteinmengen zeigen das erwartete Verhalten : ihre Summe ist für jeden einzelnen Punkt und für die gesamte Meßreihe eine Konstante. Das Versuchssystem ist quasi geschlossen, Proteinverluste können nicht auftreten.

Dagegen weisen die beiden Aktivitätskurven einen U - förmigen Verlauf auf; erst bei 60 % AS wird die Ausgangsaktivität wieder erreicht. So ist bei 40 % AS etwa 80 % der Gesamtaktivität gefällt, aber erst 30 % können im Niederschlag nachgewiesen werden.

Der Befund läßt sich wie folgt erklären : die RNA Polymerase wird schon bei relativ niedrigen AS - Konzentrationen (etwa 45 %) weitgehend gefällt. Zusätzliche Proteine, die durch AS - Fällung von der Polymerase abgetrennt werden können, die aber für die volle Aktivität des Enzyms notwendig sind, werden offensichtlich erst bei hoher AS Konzentration (60 % Sättigung) gefällt. Die volle Aktivität kann im Niederschlag erst wieder nachgewiesen werden, wenn alle Komponenten vereint sind.

Die Existenz einer stimulierenden Proteinfraction zeigte sich im folgenden Experiment : ein Chromatinzentrifugat wurde einer AS - Fraktionierung mit 45 und 60 % AS unterworfen (d.h. die AS - Konzentration im Überstand der 45 % Fällung wurde auf 60% erhöht). Die RNA Polymerase Aktivitäten in den 45 und 60 % Niederschlägen wurden einzeln und nach Vereinigung mit 0,2 und 150 ug/ml Amanitin gemessen. Tabelle 4 gibt die Aktivitäten (cpm) aufgeschlüsselt nach den drei Enzymen (A,B und C) in den getrennten und vereinten Niederschlägen.

Tabelle 4 Anreicherung eines stimulierenden Faktors für Polymerase B

	A	B	C
1) 45 % NS	530	475	270
2) 45 - 60 % NS	300	430	5
3) 1) + 2)	830	905	275
4) 45 % NS + 45 - 60 % NS	420	1530	180
5) 4) - 3)	-410	625	- 95

Bei 1) und 2) wurden 30 ul Enzymlösung + 30 ul Puffer A mit 240 ul Testmix gemessen; bei 4) 60 ul Enzymlösung mit 240 ul Testmix. Die dritte Zeile gibt die mathematische Summierung der ersten beiden Zeilen. In der vierten Zeile wurde diese Summation biochemisch vorgenommen, d.h. die Aktivitäten wurden nach Vereinigung der beiden aufgelösten Niederschläge gemessen. Die fünfte Zeile gibt die Differenz der beiden Summationsmethoden. Die Niederschläge wurden jeweils in Puffer A aufgelöst und vor Entnahme der Testproben 10 min bei 24000 g abzentrifugiert (Eppendorffzentrifuge).

Tabelle 4 zeigt mit der 5. Zeile, daß in der 45 - 60 % AS - Fällung Faktor(en) enthalten sind, die Pol B zu 70 % stimulieren, Pol A und C aber zu 50 bzw. 35 % inhibieren.

Seit es möglich geworden ist, eukaryontische RNA Polymerasen zu isolieren, wurde auch nach stimulierenden und inhibierenden Faktoren gesucht. Diese Suche war einerseits geleitet von der Vorstellung einer Analogie bakterieller und eukaryontischer RNA Polymerasen und damit gerichtet auf das Auffinden - ähnlicher Faktoren, zum andern von der Hypothese, daß die vielfältigen NHCP mit der Expression spezifischer Gene im Zusammenhang ständen.

Die Literatur berichtet von Beispielen beider Art. Über die biologische Signifikanz wurde aber in den seltensten Fällen berichtet. (Eine wichtige Ausnahme ist die zunächst als Faktor entdeckte RNase H von Stein u. Hausen (1969)). Da beträchtliche Stimulierungen und Inhibitionen bereits durch einfache chemische Verbindungen wie Glycerol oder DMSO erreicht werden können, die teilweise wesentlich über denen von Faktoren, wie sie aus der Literatur bekannt sind, liegen (z.B. Strätling, 1976; Buss u. Stalter, 1978; Mitrayev u. Belous, 1979) sollte man die Bedeutung nicht gen-spezifischer Faktoren nicht überbewerten.

Faktoren, nicht unbedingt nukleären Ursprungs, die direkt oder durch Wechselwirkungen mit Histonen oder NHCP, die Transkription in vitro beeinflussen, sind auch für Rattenleber beschrieben (Seifart et al., 1973; Sheah u. Kleinsmith, 1973; Antonoglou et al., 1973; Barbiroli et al., 1977; Yukioka et al., 1979).

Die Existenz der hier gefundenen Faktor(en), die möglicherweise nur bei hoher Ionenstärke von der RNA Polymerase abdissoziieren (vgl. Yukioka et al., 1979), bedingte, daß die AS - Fällung nicht als Anreicherungsschritt verwendet werden konnte (die Gesamtaktivität wurde nur bei vollständiger Proteinfällung wiedergewonnen). Ferner zeigte sich in vielen Experimenten, daß die Aktivitätsausbeute für die RNA Polymerasen niedriger als 100 % war (Pol B bis 55 %, Pol A bis 35 %). Offensichtlich spielen noch eine Reihe unerkannter experimenteller Einflüsse eine Rolle für die Ausbeute.

Tabelle 5 zeigt den Einfluß der Fällungsdauer in einem Experiment.

Tabelle 5 Einfluß der Fällungsdauer auf die RNA Polymerase Ausbeuten

	0	2	150	A	B	C
30 min	115/20	570/147	385/27	385	445	185
90 min	1059/10	635/20	573/76	533	424	102
150 min	998/73	694/3	692/72	693	304	2

Chromatinzentrifugat wurde mit 60 % AS gefällt, die Ansätze nach 30, 90 und 150 min abzentrifugiert und die Aktivität in den Niederschlägen mit 0,2 und 150 ug/ml Ama gemessen. Angegeben sind cpm (Mittelwert mit Standardabweichung). In den letzten drei Spalten wurden die Zählwerte auf die drei Polymerasen A, B und C umgerechnet.

Die Polymerasen B und C verloren mit zunehmender Fällungsdauer an Aktivität. Die Ausbeute an Pol A stieg. Da die Reinigung aber auf Pol B zielte wurden auch noch weitere Fällungsmethoden untersucht.

3.3.3 Polyethylenimininfällung

Das Polykation Polyethylenimin (PEI) kann sowohl Nukleinsäuren (Atkinson u. Jack, 1973) wie auch Proteine, z.B. RNA Polymerasen fällen (Zillig et al., 1970; Jendrisak u. Burgess, 1977). Dabei spielt der Polymerisationsgrad von PEI offensichtlich eine entscheidende Rolle (vgl. Abschnitt 4.2.1)

Alle im vorliegenden Abschnitt beschriebenen Experimente wurden mit einer undialysierten 10 % PEI - Lösung (pH 7,9 , HCl) durchgeführt (PEI 600, Serva, Heidelberg, Polymerisationsgrad etwa 1300).

Abb. 16 zeigt die Aktivitätsabnahme im Überstand eines Chromatinzentrifugates bei zunehmender PEI - Konzentration. Der Proteingehalt ist wegen der Schwierigkeiten bei seiner Bestimmung in Gegenwart von PEI nicht angegeben. Die starke Eigenadsorption der PEI - Lösung verhinderte auch eine spektrophotometrische Proteinbestimmung (vgl. II, 2.2.1).

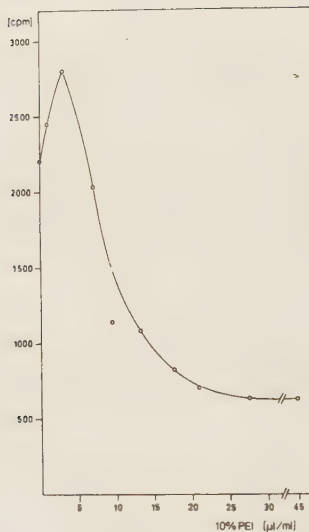


Abb. 16 RNA Polymeraseaktivität bei PEI Fällung

Je 5 ml Chromatinzentrifugat wurden mit den angegebenen Volumina PEI - Lösung gemixt und nach 45 min bei 0°C abzentrifugiert (30 min, 36000 rpm, Christ W 70). Die Aktivität im Überstand wurde bestimmt.

Nach einer anfänglichen Stimulierung der RNA Polymerase Aktivität nahm sie i.A. auf ein drittel bis ein viertel des Anfangswertes ab, und blieb danach (nicht gezeigt) bis 60 µl/ml konstant (höhere Konzentrationen waren nicht untersucht worden). Ein stimulierender Einfluß von PEI in geringen Konzentrationen wurde auch von Fukasawa et al. (1977) mit gereinigter Blumenkohl RNA Polymerase beobachtet. Die Aktivitätsabnahme im Überstand muß nicht bedeuten, daß tatsächlich auch das Enzym gefällt wurde. Es wäre denkbar, daß PEI durch Komplexierung der DNA die Aktivität des Enzyms im Test beeinflusst. Auf Schwierigkeiten bei der Aktivitätsmessung von RNA Polymerase (*E. coli*) in Gegenwart von PEI weisen auch Burgess u. Jendrisak (1975) hin.

In Tabelle 6 sind die Aktivitätsausbeuten für die Polymerasen A und B aus einem 25 µl/ml PEI - Niederschlag wiedergegeben. Ab 25 µl/ml war in mehreren Versuchen keine weitere Aktivitätsabnahme im Überstand festzustellen gewesen. Die Tabelle zeigt eine stärkere Fällbarkeit von Pol B gegenüber Pol A (die PEI - Fällung der Polymerasen aus Kalbsthymus

ergab einen ähnlichen Befund, vgl. Abschnitt 4.2.1). Geringe Ausbeuten nach der Fällung wurden auch beobachtet, wenn die Fällung in Puffern A mit anderen Salzkonzentrationen vorgenommen wurde.

Die unvollständige Fällbarkeit und die geringen Ausbeuten schlossen die Verwendung eines PEI - Schrittes in der Reinigung aus.

Tabelle 6 PEI - Fällung von RNA - Polymerase

	Vol	0	2	150	A	B	% A	% B
Chrom. ÜS	9,5	2034/334	463/27	626/26	4,69	11,77	100	100
PEI ÜS	9,5	653/51	299/26	329/17	2,46	2,65	52	22
PEI NS	2,0	750/60	178/8	191/40	0,28	0,90	6	8

Ein Chromatinzentrifugat wurde mit 25 ul/ml 10 % PEI gefällt. Nach 45 min bei 0 °C wurde der Niederschlag abzentrifugiert (30 min, 36000 rpm, Christ W 70) und mit Puffer A(300) aufgelöst; die Aktivitäten in Überstand und Niederschlag wurden mit 0,2 und 150 ug/ml Ama getestet. Die Tabelle gibt das Volumen (in ml), Mittelwerte/Standardabweichung der Meßwerte (cpm), sowie die daraus berechneten Aktivitäten der Enzyme in units und %.

3.3.4 Polyethylenglykolfällung

Außer durch pH - Erniedrigung, Aussalzen, organische Lösungsmittel und Polyelektrolyte lassen sich Proteine auch durch wasserlösliche nichtionische Polymere wie Polyethylenglykol (PEG), Polyvinylalkohol, Polyvinylpyrrolidon u.a. aus wässriger Lösung ausfällen (Polson et al.,1964; Fried u. Chun,1971).

Die biochemischen Verwendungsmöglichkeiten von PEG sind vielseitig (für eine neuere Übersicht s. Albertsson, 1977). Bei Proteinreinigungen überwiegen allerdings Arbeiten zur Fraktionierung von Serumproteinen (z.B. ein vollständig auf PEG aufgebauter Trennungsgang, Chun et al.,1967), während PEG in Enzymisolierungen noch relativ selten verwendet wurde.

Die Löslichkeitsabnahme eines Proteins in Abhängigkeit von der Polymerkonzentration folgt einer Gleichung, die auch das Aussalzen von Proteinen beschreibt (Cohn,1925 zitiert nach Dixon u. Webb,1961).

$$\lg S = k - k'z$$

S = Löslichkeit des Proteins
z = Polymerkonzentration
k, k' = Konstanten

Von verschiedenen Autoren sind Modelle vorgestellt worden, die das Fällungsverhalten erklären sollen : sterisches Ausschlußprinzip (Ogston,1958), Verteilung zwischen zwei (flüssige) wässrige Polymerphasen (Juckes,1971), gelper-

meationsähnlicher Einschluß des Proteins in PEG random coils (Polson, 1977).

Die fest - flüssig Verteilung eines Proteins wie sie bei einer gewöhnlichen Fällung vorliegt, ist in PEG - Systemen nur ein Grenzfall. Foster et al. (1973) fanden die ADH aus *S. cerevisiae* mit zunehmender Ionenstärke zwischen fester und flüssiger, einer festen und zwei flüssigen bzw. zwischen zwei flüssigen Phasen verteilt.

Wie sich ein Protein zwischen zwei Phasen eines PEG - Systems verteilt wird entscheidend durch die relative Aufladung der beiden Phasen bestimmt, ist somit stark von der Wahl des Salzes und Puffers abhängig (Albertsson, 1977; Pflugfelder, 1977).

Abb. 17a) zeigt die Aktivität im Überstand eines Chromatinzentrifugates nach Fällung mit PEG 4000. Zwei Experimente sind dargestellt, von denen eines aufgeschlüsselt ist nach Pol (A + C) und Pol B. Nach einer anfänglichen Stimulierung bei geringen PEG - Konzentrationen wurden beide Aktivitäten bei 25 % PEG vollständig gefällt. In den meisten Fällen wies der Überstand der 7,5 % Fällung höhere Aktivität als das Chromatinzentrifugat auf. Wegen der Schwierigkeit den Proteingehalt in Gegenwart von PEG zu bestimmen (s. II, 2.2.1), wurde die Fällung des Gesamtproteins über die Extinktion bei 280 nm verfolgt.

In Abb. 17b) ist der Logarithmus der Gesamtaktivität bzw. von E(280) gegen die PEG - Konzentration aufgetragen. Die Abweichung von der Linearität bei hohen PEG - Konzentrationen in der E(280) Kurve rührt von der Turbidität der Lösungen in diesem Konzentrationsbereich. Die Aktivitätskurve ist nur im nicht - stimulierten Bereich aufgetragen, ist dort aber linear. Ein exponentieller Abfall von Aktivität und Proteingehalt mit der PEG - Konzentration wird somit beobachtet.

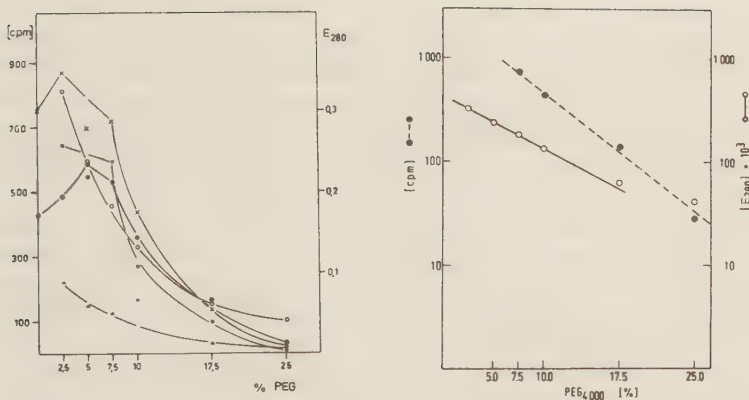


Abb. 17 RNA Polymerase Aktivität und Proteingehalt bei PEG Fällung

a) 5 ml Aliquots eines Chromatinzentrifugates wurden mit gemahlenem PEG 4000 versetzt. Nach 3 h bei 0 C wurden die Proben abzentrifugiert (60 min, 36000 rpm, Christ S40). Die Aktivitäten im Überstand wurden mit 0 und 2 ug/ml Amagetestet. E(280) wurde in 1:10 Verdünnung bestimmt. Die PEG - Konzentration ist in Gewichtsprozent pro Ausgangsvolumen angegeben.

Experiment 1 +—+ Gesamtaktivität
 ■—■ Polymerase A
 △—△ Polymerase B
 Experiment 2 ●—● Gesamtaktivität
 ○—○ E(280)

b) Gesamtaktivität bzw. E(280) aus Abb. 17a (Exp. 2) in logarithmischer Darstellung

Die Aktivität, die bei Auflösen des 25 % PEG pellets mit Puffern A unterschiedlicher Ionenstärke gemessen werden konnte, war sehr niedrig (teilweise unter 10% der eingesetzten Aktivität). Die Möglichkeit, daß die Polymerase gar nicht gefällt, ihre Aktivitätsabnahme im Überstand beispielsweise allein auf einer Inaktivierung des Enzyms oder des templates beruhte, war aber aus verschiedenen Gründen unwahrscheinlich.

1) Gesamtprotein war bei 25 % PEG weitgehend vollständig gefällt. Nach dem sterischen Ausschlußprinzip sollten große Proteine vor kleinen gefällt werden. Dies wurde in der Literatur teilweise auch beobachtet (Ingham, 1978). RNA

Polymerase sollte der Masse nach ($M > 500 \text{ kD}$) vor der Hauptmenge des Proteins fallen. Bemerkenswerterweise blieb die Aktivität aber bis 7,5 % PEG etwa konstant, obwohl in diesem Punkt die Gesamtproteinkonzentration schon deutlich erniedrigt war. Es wäre denkbar, daß die RNA Polymerase in diesem Konzentrationsbereich eine Konformationsveränderung erfährt, die sowohl die Konstanten k und k' in der Fällungsgleichung verändert als auch zu einer Aktivitätssteigerung führt.

2) Wurde der aufgelöste 25 % PEG Niederschlag auf eine Heparinsäule gegeben, ließ sich manchmal bis zu 100 % der mit dem Chromatinzentrifugat eingesetzten Aktivität wiedergewinnen, obwohl im 25 % PEG Niederschlag diese kaum nachweisbar war.

3) Bei einer Phasenverteilung im 25 % PEG System bei höherer Ionenstärke war die Aktivität in der flüssigen Unterphase, die dann auch eine andere Zusammensetzung hatte (Albertsson, 1971), voll nachweisbar.

Die teilweise reduzierte Aktivität des Enzyms in PEG Lösungen könnte durch einen Einfluß des PEG auf das template bewirkt sein. Lerman (1971) zeigte mit hydrodynamischen Methoden, daß schon geringe PEG - Konzentrationen ausreichen, einen kooperativen Kollaps der DNA Struktur zu hochgefalteten Strukturen herbeizuführen. Diese wurden von Laemmli (1975) elektronenmikroskopisch und mit Nukleaseverdauemethoden untersucht. Nach diesen Ergebnissen liegen wohlgeordnete Strukturen vor, in denen die DNA alle 200 bis 400 bp gefaltet ist. In Einklang damit schloß Griffith (1978) eine Veränderung der DNA Helizität, z.B. eine Induktion von Supercoils, durch PEG aus. Nach meiner Kenntnis ist die Transkribierbarkeit solcher Strukturen in der Literatur nicht untersucht worden. Es kann jedoch eine strukturelle Inhibition der Transkription vermutet werden. Sie könnte die geringe im 25 % PEG Niederschlag nachweisbare Aktivität erklären. Ohne weitere Informationen, z.B. über die tatsächliche PEG Konzentration in dieser Lösung, ist die Erklärung zunächst nur spekulativ. Eine Inhibition von Rattenleber RNA Polymerase durch PEG 400 wurde von Mitrayev u. Belous (1979) beschrieben.

Auf grund dieser Ergebnisse wurde die fraktionierte PEG Fällung mit einer 7 % Vorfällung und einer 25 % Hauptfällung in die im Methodenteil beschriebene Reinigung aufgenommen. Das Enzym bereits nach der 7 % Fällung auf die nachfolgende Säule zu geben, war wegen der hohen Viskosität der Lösung nicht möglich. Die 25 % Fällung verringerte außerdem das Volumen der aufzutragenden Lösung, damit die Dauer des nächsten chromatographischen Schrittes.

3.4 Chromatographie

3.4.1 DEAE Sephadex Chromatographie nach Ammoniumsulfatfällung

DEAE Chromatographie nach einer AS Fällung des primären Chromatinextraktes, ist bei RNA Polymerase Reinigungen verbreitet und wird in allen vier beschriebenen Isolierungen von Pol B aus Rattenleber angewandt (Weaver et al., 1971; Mandel u. Chambon, 1971; Chesterton u. Butterworth, 1971; Seifart et al., 1972).

In meinen Vorversuchen zur AS Fällung mit relativ kleinen Mengen an Ausgangsmaterial (35 g Rattenleber) traten bei den Fällungen Aktivitätsverluste auf. Auftrag des aufgelösten und u.U. dialysierten pellets einer 60 oder 75 % AS Fällung auf eine DEAE Säule führte zwar zu der von Röder u. Rutter beschriebenen vollständigen Auftrennung von Pol A und B (s. Abb. 18), die aber auch hier von Aktivitätseinbußen begleitet war. Die Methode war der Chromatographie auf Heparin - Sepharose nach vorheriger PEG Fällung deutlich unterlegen.

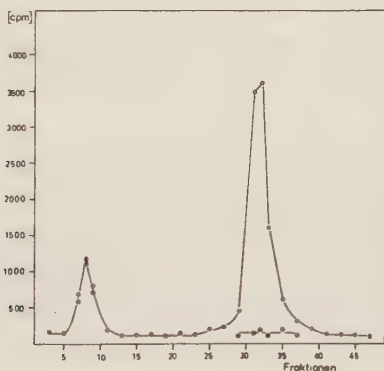


Abb. 18 DEAE Sephadex Chromatographie von RNA Polymerase aus Rattenleber

27,5 ml Chromatinzentrifugat (s. II, 2.1.4) wurden mit 60 % AS gefällt und nach einer h abzentrifugiert (60 min, 30000 rpm, Christ S30). Der Niederschlag wurde in 5 ml Puffer A aufgelöst und auf eine DEAE Säule gegeben (1,06 x 16,7 cm, Laufgeschwindigkeit 26 ml/h, 18 Tropfen/Fraktion) (das Gel war vorbehandelt nach Kirkegaard et al., 1972). Die Enzymaktivität wurde mit 0, in den peak - fraktionen auch mit 2 µg/ml Ama gemessen.

- — ○ 0 µg/ml Ama
- — ● 2 µg/ml Ama

3.4.2 Heparin Sepharose Chromatographie nach PEG Fällung

Heparin ist ein natürlich vorkommendes hochsulfatisiertes Mucopolysaccharid, das aus dem nativen Proteoglycan kommerziell durch drastische Abbaumethoden als heterogenes Präparat erhalten wird. Es wurde als Initiationsinhibitor erstmals von Zillig im Zusammenhang mit RNA Polymerase (*E. coli*) verwendet (Walter et al., 1967).

Sein physiologisches Wirkungsspektrum ist außerordentlich komplex (Jacques 1979). Während die Beziehung zwischen Struktur und anticoagulierender Wirkung intensiv erforscht wird (z.B. Hurst et al., 1979; Rosenberg u. Lam, 1979; Holmer et al., 1979; Nordenman et al., 1978) liegen meines Wissens keine Untersuchungen darüber vor, ob Heparin allein durch seine hohe anionische Dichte ein so geeignetes chromatographisches Medium zur Reinigung von RNA Polymerase ist, oder ob spezifische Wechselwirkungen mit dem Enzym existieren (z. B. wurde von mir beobachtet, daß das Retentionsvermögen von Heparinsäulen mit Gebrauch abnahm, der Sulfatgehalt häufig gebrauchten Gelmaterials aber nicht wesentlich reduziert war).

Heparin Sepharose wurde zuerst von Sternbach et al. (1975) zur Reinigung einer RNA Polymerase verwendet (*E. coli*), eignet sich aber auch gut für die Reinigung der eukaryontischen RNA Polymerasen A, B und C.

z.B. A Ratte (Coupar et al., 1977)

B *Drosophila melanogaster* (Greenleaf et al., 1976)

Physarum polycephalum (Smith u. Braun, 1978)

C Weizen (Teissere et al., 1977)

KB Zellen (Jaehning et al., 1977)

Heparin Sepharose wurde hergestellt wie im Methodenteil beschrieben. Sie ist mittlerweile kommerziell erhältlich; eine Informationsbroschüre (Pharmacia 1979) führt eine Vielzahl weiterer Verwendungsmöglichkeiten auf.

Abb. 19 zeigt einen Heparin Sepharose Lauf.

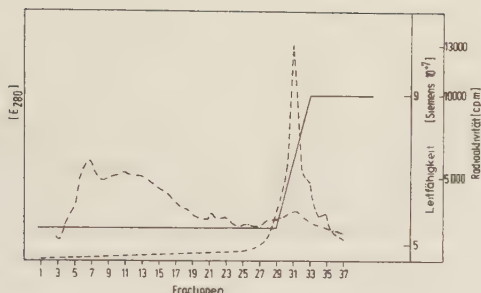


Abb. 19 RNA Polymerase auf Heparin Sepharose

Zellkerne von etwa 30 Ratten wurden aufgearbeitet wie unter Methoden beschrieben. Der 25 % PEG Niederschlag wurde in 9 ml Puffer A aufgelöst und auf eine 2 x 21 cm Heparin Sepharose Cl. 4B Säule, äquilibriert im selben Puffer, aufgetragen. die Säule wurde mit 1,5 Säulenvolumina (100 ml) Puffer A(300) gewaschen, die Aktivität mit 120 ml Puffer A(500) eluiert (100 Tropfen/Fraktion, 45 ml/h). Die Extinktion bei 280 nm (-----) wurde in einer Durchflußzelle gemessen. Bestimmung der Aktivität (-----) und Leitfähigkeit (————) wie unter Methoden beschrieben.

Die Ausbeuten an Polymerase B lagen zwischen 50 und 100 %, die Anreicherung war je nach Ausbeute 10- und 20- fach . In einer Serie von Experimenten war gefunden worden, daß eine Auftragung in Puffer A(300) mit nachfolgender Stufenelution mit Puffer A(500) die besten Ergebnisse brachte. Durch die Auftragung bei relativ hoher Ionenstärke wird eine starke Wechselwirkung zwischen Heparin und Enzym vermieden. Gradientenelution brachte keine höhere Anreicherung, lieferte dagegen das Enzym in einer verdünnteren und labileren Form.

In 4.3.3 wird gezeigt, daß Heparin und nicht die Sepharose Gelmatrix selbst, für den chromatographischen Effekt verantwortlich ist.

Die Ausbeuten an Pol A lagen häufig bei nur 10 % . Wegen der schlechten Meßbarkeit der Aktivität im PEG Niederschlag kann nicht gesagt werden , auf welcher Stufe der Aktivitätsverlust eintrat.

Um für nachfolgende chromatographische Schritte das Enzym in einer konzentrierteren und salzärmeren Form zu bekommen, wurde versucht , die gepoolten aktiven Fraktionen nach der Heparin Sepharose Chromatographie mit AS oder PEG zu fällen. Beide Methoden waren aber verlustreich. Dagegen verlief eine

Dialyse gegen Puffer A stets mit leichter Aktivitätszunahme (wahrscheinlich wegen der geringeren Ionenstärke im Test).

3.4.3 DEAE Sephadex Chromatographie nach Heparin Sepharose

DEAE A 25 Chromatographie des dialysierten Eluats von der Heparinsäule brachte eine Abtrennung von der Pol A Restaktivität, eine nochmals starke Anreicherung (etwa 15 - fach) und lieferte das Enzym in relativ konzentrierter Form. Auch hier erwies sich Stufenelution gegenüber einer Gradientenelution als vorteilhaft (vgl. 4.3.4).

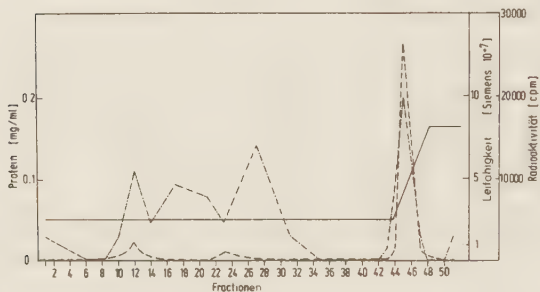


Abb. 20 DEAE A 25 Chromatographie von RNA Pol B

100 g Rattenleber wurden wie unter Methoden beschrieben aufgearbeitet. Die aktiven Fraktionen nach Heparin Chromatographie wurden gepoolt und dialysiert bis eine AS Konzentration von 100 mM erreicht war. 33 ml Dialysat (Proteinkonzentration 0,22 mg/ml) wurden auf eine DEAE Säule (0,9 x 4,5 cm, Vol = 2,9 ml) (äquilibriert mit Puffer A(100)) aufgetragen. Es wurde mit 6 ml Puffer A(100) gewaschen, dann mit 10 ml Puffer A(500) eluiert (30 ml/h, 15 Tropfen/Fraktion). Protein wurde nach Hartree (1972) bestimmt.

----- Proteinkonzentration mg/ml
 ————— Leitfähigkeit Siemens
 Radioaktivität cpm

In Abb. 20 ist ein DEAE Lauf mit Leitfähigkeits-, Aktivitäts- und Proteinprofil dargestellt. Sie zeigt die Symmetrie und Koinzidenz von Aktivitäts- und Proteinpeak. Dies kann als erstes Reinheitskriterium gewertet werden.

3.5 RNA Polymerase C in Rattenleberzellkernen ?

Die Literatur ist widersprüchlich hinsichtlich Existenz und Lokalisierung von RNA Pol C in der Rattenleberzelle. Röder u. Rutter (1969), Coupar u. Chesterton (1975), Shields u. Tata (1976) sowie Coupar u. Chesterton (1977) konnten das Enzym im Zellkern nicht nachweisen. Seifart et al. (1972) erharteten durch einen positiven Nachweis die Lokalisierung von Pol C im Cytoplasma. Goldberg et al. (1977) fanden dagegen bis zu 18 % der Gesamt RNA Pol Aktivität des Zellkerns als Pol C, wobei der Gehalt allerdings stark schwankend war. Sie zeigten, daß Pol B und C leicht aus dem Zellkern gewaschen werden können. Die unterschiedlichen Befunde können somit auf Unterschiede in der Kernisolationmethode zurückgeführt werden. Genauere Information über den Gehalt der einzelnen Polymerasen würde wohl erst eine nicht - wässrige Kernisolationmethode liefern. Aber bereits die Isolierung der Zellkerne in hyperosmotischer Sucrose (2,4 M) zeigt konsistent die Anwesenheit von Pol C in dieser Organelle (Beebe, 1979).

In eigenen Aufarbeitungen fand ich auf den ersten Reinigungsschritten ebenfalls einen Pol C Gehalt zwischen 0 und 18 % (s. Tabelle 3). Die Tabelle zeigt auch die Labilität des Enzyms : nach längerer AS Fällungsdauer ging die Ausbeute auf 0 % zurück. Im allgemeinen war der Polymerase C Gehalt bereits im Chromatinzentrifugat so niedrig, daß diese Aktivität während der Reinigung nicht verfolgt wurde.

3.6 Zusammenfassende Betrachtung der Reinigung

Die beschriebene Methode zur Isolierung von RNA Polymerase B aus Rattenleber besteht aus drei einfachen Schritten : einer fraktionierten PEG Fällung mit anschließenden Chromatographien auf Heparin Sepharose und DEAE A 25. Die Reinigung geht schnell und läßt sich in 2 - 3 Tagen bewältigen. Eine Dialyse findet erst nach einem effektiven chromatographischen Schritt, der Heparin Sepharose, statt. Dadurch wird die Möglichkeit zum proteolytischen Abbau des Enzyms reduziert.

Während der Reinigung wurde durchgehend auf eine Stabilisierung des Enzyms mit BSA verzichtet, da Transkriptionsuntersuchungen durch die Bindungseigenschaften und Nukleasekontaminationen von BSA gestört werden (Riva et al., 1972; Mandel u. Chambon, 1974b; Rose et al., 1975; Kastern et al., 1979).

Verschiedene Aufarbeitungen unterschieden sich auf der Stufe des Chromatinzentrifugates in ihrer Gesamtaktivität bis zu einem Faktor 4, wobei der Anteil an Pol A um so höher

war, je niedriger die Gesamtaktivität lag.
 Pol A machte i.A. 25 bis 40 % der Gesamtaktivität aus.

Ratten beider Geschlechter mit Gewichten zwischen 80 und 250 g wurden in verschiedenen Ansätzen aufgearbeitet. Die Zahl der Zellkerne pro Rattenleber war altersunabhängig. Ohne daß systematisch der Einfluß des Rattenalters auf die Polymeraseaktivität im Aufschluß untersucht worden wäre, entstand der Eindruck, daß junge Ratten höhere Aktivitäten lieferten, die weitere Reinigung aber verlustreicher verlief. Die spezifische Aktivität am Ende der Reinigung war aber jeweils gleich. Eine höhere primäre Aktivitätsausbeute bei jungen Ratten wurde auch von Seifart u. Sekeris (1969) beobachtet. Ohne eingehende Untersuchung kann aber nicht entschieden werden, ob in der jungen Ratte eine höhere Konzentration an Enzym vorliegt oder ob dieses nur leichter extrahierbar ist. Die Problematik ist von Shields u. Tata (1976) grundlegend untersucht worden.

Neben dem Einfluß der Wachstumsrate können der Ernährungszustand, der Zeitpunkt der Schlachtung und möglich auch Stressfaktoren für die Aktivitätsausbeute eine Rolle spielen, wobei ein einheitlicher Wirkmechanismus, nämlich über den Hormonspiegel, durchaus denkbar wäre. In den folgenden Zitaten sind diese Einflüsse im Zusammenhang mit Rattenleber RNA Polymerase untersucht worden :

Ernährung : in gehungerten Ratten reduziert sich die Zahl der RNA Pol B Moleküle (Coupar et al., 1978) ; Tryptophandiet kann das Verhältnis von freier zu template-gebundener RNA Pol verschieben (Majumdar, 1978).

Zeitpunkt der Schlachtung : gegenläufige tageszeitliche Schwankungen von Pol A und B (Glasser u. Spelsberg, 1972).

Hormonspiegel : Hormongaben verändern Aktivität und spezifische Aktivität von Pol A (Todhunter et al., 1978).

Auf die Konstanz all dieser Faktoren, die die Ausbeute im primären Chromatinzentrifugat und auch noch danach (Shields u. Tata, 1976) bestimmen können, wurde wegen der unterschiedlichen Bezugsquellen für die Ratten nicht geachtet.

Der Zeitaufwand und die Ausbeuten der hier beschriebenen Reinigung sowie die Ausbeuten pro 100 g eingesetzte Rattenleber lassen sie im Vergleich mit publizierten Vorschriften vorteilhaft erscheinen. Weaver et al. (1971), Mandel u. Chambon (1971), Chesterton u. Butterworth (1971) erhielten das Enzym mit spezifischen Aktivitäten von 50 - 250 u/mg bei einer Ausbeute von 4 - 40 u/100 g Rattenleber. Bei vergleichbarer spezifischer Aktivität (210 u/mg) fand ich Ausbeuten zwischen 20 und 80 u/100 g Rattenleber (Lebergewicht zwischen 7 und 9 g, 100 - 200 g Rattengewicht).

Tabelle 7 faßt eine Reinigung zusammen, die von 245 g Leber junger Ratten ausging.

	Volumen (ml)	Protein (μ g/ml)	Akt.(0) (cpm)	Akt.(2) (cpm)	Akt.(3) (u/ml)	Akt.(4) (u/ml)	spez. Akt. (u/mg)	spez. Akt.(A) (u/mg)	Akt.(B) (u)	Akt.(A) (u)	% B	% A	Anreicherung (B)
Chromatinsentrifugat	206	1,40	3193	817	1,87	0,56	1,34	0,58	386	116	100	100	1
7 % PEG Überstand	215	372	2930	775	1,70	0,55	372	372	365	115	94,7	98,8	372
25 % PEG Niederschlag	9	9,6	19064	1477	15,3	1,1	1,39	0,11	120	10	31,1	8,2	1
Heparin-pool (vor Dial.)	61	0,22	4554	386	3,29	0,22	14,9	1,02	200	14	51,9	11,7	11
Heparin-pool (nach Dial.)	61	0,22	4796	385	3,48	0,22	15,8	1,02	212	14	54,9	11,7	12
D2AE-pool	6	0,15	41452	113	32,6	0	210	0	196	0	50,7	0	157

Tabelle 7 Reinigung von RNA Polymerase B aus Rattenleber

245 g Rattenleber aus 100 g schweren, weißen Wistarratten wurden wie im Methodenteil beschrieben aufgearbeitet. Protein wurde mit der Biuretmethode, sowie nach Hartree bestimmt. Der Proteinwert des 25 % PEG Niederschlages ist wegen der Störung der Proteinbestimmung durch PEG mit größerem Fehler behaftet (s. II,2.2.1). Akt.(0) und Akt.(2) geben die säurefällbare Radioaktivität im Standardtest mit 0 und 2 μ g/ml Amanitin. Daraus wurden, unter Vernachlässigung der Polymerase C, die Aktivitäten der Polymerasen A und B in u/ml, zusammen mit den Proteinwerten die spezifischen Aktivitäten in u/mg und zusammen mit den Volumina die Gesamtaktivitäten in u für die beiden Polymerasen auf den einzelnen Reinigungsstufen berechnet.

Die nur geringe benötigte Anreicherung von 150 - 200 fach stimmt überein mit den Molekülzahlen pro Zellkern, die von anderen Autoren bestimmt worden sind (etwa 40000 Pol B Moleküle pro Rattenleberzellkern; Cochet-Meilhac et al.,1974; Beebe,1979). Mit einer Molmasse von 500 kD (Chambon 1975) ergibt sich für den Zellkern eine Gesamtmasse an Pol B von $3,2 \times 10^{-14}$ g. Bei 5 pg DNA/Zellkern (Beebe 1979) ist der RNA Pol B Gehalt, bezogen auf die DNA Masse etwa 0,64 %. Nimmt man überschlagsmäßig ein 1:1:1 - Verhältnis von DNA : Histon : NHCP (w/w/w) an (Tata u. Baker,1978), sowie weiter, daß bei der Aufarbeitung die NHCP vollständig, die Histone aber gar nicht in das Chromatinzentrifugat gehen, so macht RNA Pol B auch 0,64 % des Proteins im Chromatinzentrifugat aus. Zur Reingewinnung des Enzyms wäre dann eine 156 - fache Anreicherung notwendig, was überraschend gut mit der im Beispiel gezeigten 157 - fachen Anreicherung übereinstimmt.

3.7 Elektrophoretische Charakterisierung der RNA Polymerase B aus Rattenleber

Da der Schwerpunkt der Arbeit auf transkriptionellen und nicht auf enzymologischen Untersuchungen liegen sollte, beschränkte sich die Charakterisierung des Enzyms auf Elektrophoresen unter nativen und denaturierenden Bedingungen.

Abb. 21 zeigt die Gelelektrophorese unter nicht-denaturierenden Bedingungen von zwei Fraktionen aus dem Aktivitätspeak eines DEAE Laufes, entsprechend etwa den Fraktionen 44 und 46 in Abb. 20. Durch Anfärben und Extinktionsmessung der Gele, sowie Planimetrieren der erhaltenen Kurven wurde gleichzeitig eine unabhängige Methode zur Bestimmung der Proteinkonzentration erhalten. Zur Eichung dienten verschiedenen konzentrierte BSA Lösungen, die ebenfalls elektrophoretisiert und dann in gleicher Weise ausgewertet wurden (s. II,2.2.1).

Die Proteinbestimmung in Lösung und auf dem Gel ergaben gleiche spezifische Aktivitäten.

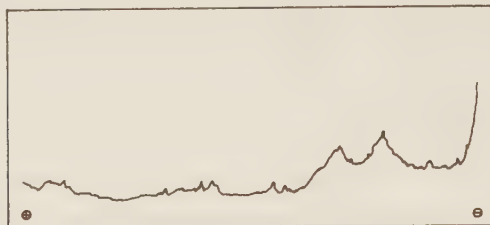


Abb. 21 Elektrophorese unter nicht-denaturierenden Bedingungen von RNA Polymerase B

4,5 % Polyacrylamidgele in einem Tris Puffersystem (pH 8,8) wurden wie im Methodenteil beschrieben hergestellt. Aktive Fraktionen aus einem DEAE Lauf wurden gegen 2,5 mM Tris, 3,3 mM Glycin, 0,1 mM AS, 0,01 mM DTE, 40 % Glycerol dialysiert. Die Proben wurden 0,001 % an Bromphenolblau gemacht und in unterschiedlichen Volumina (20 - 50 μ l) aufgetragen. Beide Elektrodenräume enthielten DTE, aber keine Thioglykolsäure. Die Bedingungen für Elektrophorese, Färben, Entfärben, Vermessen und Planimetrieren der Gele sind im Methodenteil beschrieben.

Alle auf diese Weise untersuchten aktiven DEAE Fraktionen wiesen zwei peaks auf. 2 oder 3 peaks bei der nicht denaturierenden Elektrophorese wurden auch unter anderen Reinigungsbedingungen gefunden (Weaver et al., 1971; Mandel

u. Chambon, 1971).

Abb. 22a) zeigt die SDS Elektrophorese einer DEAE peak Fraktion. In Abb. 22b) sind die Laufstrecken der einzelnen Banden in eine Kurve gezeichnet, die aus einer Auftragung der Laufstrecken von Markerproteinen gegen den Logarithmus ihrer Molmassen erhalten wurde.

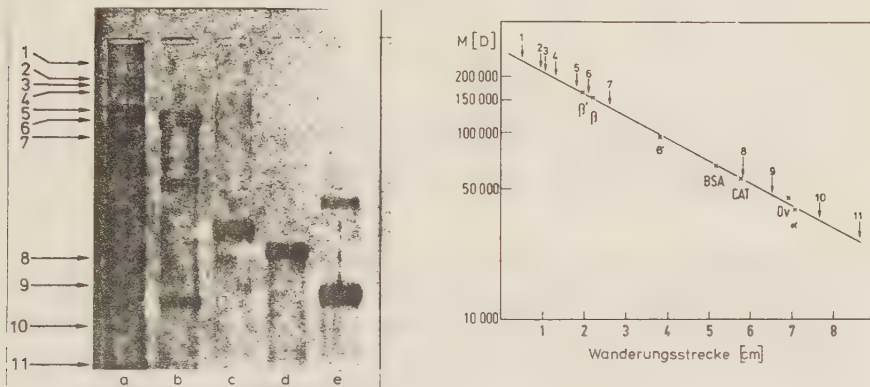


Abb. 22 SDS Elektrophorese von RNA Polymerase B aus Ratten leber

a) In den Spalten a - e wurden aufgetragen : a RNA Polymerase B (DEAE peak Fraktion), b E. coli RNA Polymerase ($\alpha = 39$, $\beta = 95$, $\beta' = 155$, $\beta'' = 165$ kD, Burgess, 1969), c BSA (67,5 kD), d Catalase (57,5 kD), e Ovalbumin (24 kD). Elektrophoresebedingungen, Färbe- und Entfärbemethodik wie im Methodenteil beschrieben.

b) Halblogarithmische Darstellung der Markerproteinlaufstrecken gegen den Logarithmus der Molmassen. Die Pfeile kennzeichnen die Laufstrecken der in a) markierten Banden.

Den eingezeichneten Banden 1 - 11 kommen danach folgende Molmassen zu :

240, 215, 210, 195, 170, 158, 137, 57, 47, 34, 27,5 kD.

Bei verkürzter Elektrophoresedauer ließen sich auch noch Banden bei 25, 20, 15, 14 und 11,5 kD ausmachen.

Besonders charakteristisch war das Heptett von Banden hoher Molmasse.

Aus der Tatsache der Koinzidenz von Aktivität und Protein im DEAE peak , sowie der Konstanz des Bandenmuster über die aktiven Fraktionen eines peaks folgt, daß die beobachteten Banden während der durchgeführten Schritte ein einheitliches Reinigungsverhalten aufwiesen. Ohne die Zuordnung einer funktionellen Bedeutung (vgl. 4.4) sollten sie aber noch

nicht als Untereinheiten bezeichnet werden.

In den verschiedenen publizierten Reinigungen wurden unterschiedliche SDS Muster von RNA Polymerase B gefunden (Peptidmasse in kD).

1. Weaver et al. (1971) 190, 170, 150, 35, 25
2. Mandel u. Chambon (1971) 230, 215, 185, 150
(die Gele zeigen eine Reihe schnellerer Banden, die aber von den Autoren nicht diskutiert werden)
3. Keding et al. (1974) 220, 214, 180, 165, 140, 34, 26,
20,5, 16,5
4. Chesterton u. Butterworth (1971) 200, 180, 160
5. Coupar et al. (1977) 215, 180, 140, 35, 26, 19
(wobei die drei hochmolekularen Banden deutlich als Doppelbanden zu erkennen sind)
6. Seifart et al. (1972) 3 bzw. 6 Banden ohne Zuordnung
(auf 4 bzw. 10 % PAA Gel)

Die geringere Zahl der von den Autoren gefundenen niedermolekularen Banden erklärt sich teilweise aus der Verwendung niedrigprozentiger (4 oder 5 %) PAA Gele. In späteren Arbeiten finden gleiche Gruppen durch Verwendung höherprozentiger Gele stets eine vermehrte Zahl von Untereinheiten.

Sieht man von der bei der hier beschriebenen Reinigung auftretenden und stets schwachen Bande bei 240 kD ab, so besteht im Bereich der schweren Untereinheiten relativ gute Übereinstimmung mit Keding et al. (1974) und Coupar et al. (1977).

Das Auftreten der 240 kD Bande könnte an der hier beschriebenen schnelleren Aufarbeitungsmethode liegen, die weniger Gelegenheit zur Proteolyse läßt. Der partielle proteolytische Abbau schwerer RNA Polymerase Untereinheiten ist an einer Reihe von Beispielen gezeigt worden (Weaver et al., 1971; Greenleaf et al., 1976; Dezelee et al., 1976; Osuna et al., 1977; Guilfoyle u. Jendrisak, 1978).

Die hier gefundene Anzahl an kleineren Polypeptiden (9) steht in Einklang mit der Struktur von Pol B aus einem weiten Bereich anderer Organismen :

Kalbsthymus : 9 (Hodo u. Blatti, 1977)

Weizenkeim : 10 (Hodo u. Blatti, 1977)

11 (Jendrisak u. Burgess, 1977)

Drosophila melanogaster : 8 (Greenleaf u. Bautz, 1975)

Hefe : 8 (Buhler et al., 1976)

Der komplexe Aufbau des Enzyms läßt weiten Raum für enzymologische Untersuchungen, die aber noch kaum begonnen haben.

4. Isolierung und Charakterisierung von RNA Polymerase B aus Kalbsthymus

Für eine Einführung in die Methodologie der Reinigung sei hier auf den entsprechenden Abschnitt bei der Reinigung der RNA Polymerase aus Rattenleber (s. 3.1) verwiesen.

4.1 Extraktion der RNA Polymerasen aus dem Kalbsthymusgewebe

Kalbsthymus (CT) hat verglichen mit anderen Geweben einen hohen Gehalt an RNA Polymerase (Kedinger et al., 1972). Der Kern macht einen großen Anteil der Zellmasse aus, so daß auf eine vorherige Isolierung der Kerne verzichtet werden kann.

Zur Isolierung von RNA Pol aus CT sind in der Literatur zwei Aufarbeitungsprinzipien beschrieben.

- 1) Homogenisieren des Gewebes bei hoher Salzkonzentration (z.B. 0,3 M AS, Kedinger et al., 1971; Kedinger et al., 1972; Ingles, 1973; Grade et al., 1977)
- 2) Homogenisieren des Gewebes bei geringer Ionenstärke (< 100 mM z.B. Schmincke u. Hausen, 1973; Hodo u. Blatti, 1977) In Vorversuchen wurden beide Methoden verglichen.

1) Gefrorener und in kleine Stücke zerschlagener CT wurde in Puffer A (s. II, 2.1.4) getaut. Durch Zugabe von 3 M AS wurde die AS Konzentration auf 0,3 oder 0,6 M AS gebracht. Es bildete sich in beiden Fällen eine zähe, kautschukartige Masse. Ein gewöhnlicher Küchen - Schlagkreuzmixer war beim Homogenisieren dieses Materials wirkungsvoller als Beschallern oder Behandeln mit einem Ultra Turrax.

Das Homogenisat wurde entweder auf 100 mM AS verdünnt und nach Zentrifugation die Aktivität im Überstand getestet, oder die AS Konzentration wurde auf 40 % Sättigung erhöht und die Aktivität im erhaltenen Niederschlag bestimmt.

In beiden Fällen war die Ausbeute gering (In einer späteren Modifikation ihrer Aufarbeitung gehen auch die Autoren dieser Methode von der Homogenisierung bei hoher Ionenstärke ab; Wasylyk u. Chambon, 1979). Geringe Ausbeuten nach einer AS Fällung wurde auch von Schmincke u. Hausen (1973) beobachtet.

2) Homogenisieren des Gewebes bei niedriger Ionenstärke erwies sich als effektiver und wird hier eingehender besprochen.

Wie im Methodenteil beschrieben wurde CT in HB Puffer A und B homogenisiert und die Dauer des Mixens auf den einzelnen Stufen variiert. dabei erwies es sich, daß das Schema von Hodo u. Blatti (1977) tatsächlich optimale Ausbeuten an Polymerase B brachte.

Die Tabellen 8a) und b) zeigen den Einfluß von verlängerter

und verkürzter Mix - Dauer (die in Tabellen beschrieben Experimente wurden mit zwei verschiedenen Aufarbeitungen durchgeführt).

Tabelle 8 Homogenisierungsdauer und Aktivitätsausbeute

Schema	cpm(0)	cpm(2)	cpm(150)	A	B	C	% A	% B	% C
1)	770/10	274/18	192/38	192	496	82	25	64	11
2)	466/16	190/15	148/7	148	276	42	32	59	9
3)	445/117	192/11	145/3	145	253	47	33	57	10
4)	443/25	190/10	125/2	125	253	65	28	57	15
5)	696/9	516/2	323/2	323	180	193	46	26	28
6)	690/52	490/30	273/15	273	200	217	40	29	31
7)	731/10	469/28	284/6	284	262	185	39	26	25
8)	716/12	441/21	281/5	281	275	160	39	38	23

Erläuterung der Mixschemata

- 1) je 30 s in HB A (I,II,III); 30 s HB B (I) (120)
 2) je 30 s in HB A (I,II,III); je 30 s HB B (I,II,III) (180)
 3) je 60 s in HB A (I,II,III); 30 s HB B (I) (210)
 4) je 30 s in HB A (I,II,III); je 60 s HB B (I,II,III) (270)
 5) je 15 s in HB A (I,II,III); 15 s HB B (I) (60)
 6) je 20 s in HB A (I,II,III); 20 s HB B (I) (80)
 7) je 25 s in HB A (I,II,III); 25 s HB B (I) (100)
 8) je 30 s in HB A (I,II,III); 30 s HB B (I) (120)

Jeweils 90 g CT wurden mit je 180 ml HB Puffer A und B nach den angegebenen Schemata homogenisiert. Nach Zentrifugation (30 min, 15000 rpm, Kontron HF20) wurde die Aktivität im Überstand mit 0, 2 und 150 ul/ml Ama bestimmt. Die römischen Zahlen in den Schemata geben die Schalterstellung des Braun Küchenmixers. Zuletzt ist die Gesamtmixdauer (in Sekunden) angegeben.

Die ersten drei Spalten der Tabelle geben die bei den verschiedenen Amanitinkonzentrationen gemessenen cpm, einschließlich der aus zwei oder drei Einzelmessungen bestimmten Standardabweichung. Danach folgen die getrennten Aktivitäten der drei Polymerasen (in cpm), sowie ihr Anteil an der Gesamtaktivität.

HB A und HB B in den Schemata bedeuten HB Puffer A und B (s. II, 2.1.5).

Die Schemata 1) und 8) (gleiches Mixschema) geben sowohl eine hohe Gesamtausbeute wie auch einen relativ hohen Pol B Anteil.

Neben der Homogenisierungsdauer wurde auch noch eine andere Variable gefunden, die Einfluß hat auf Gesamt- und Relativausbeuten der drei RNA Polymerasen A, B und C. Jeweils 7 Aufarbeitungen wurden mit und ohne einige Tropfen

" Antischaum " durchgeführt (Antischaum ist ein nicht - ionisches Siloxandetergens der Fa. Wacker Chemie, Burzdorf, FRG).

Dabei fanden sich signifikante Unterschiede in der Gesamtausbeute (gemessen auf der Stufe des Chromatinzentrifugates : 898/248 cpm mit vs. 528/130 cpm ohne Antischaum) wie auch im Pol B Anteil an der Gesamtaktivität (gemessen auf der Stufe des PEI Überstandes : 64/7 % mit vs. 43/7 % ohne Antischaum) (jeweils Mittelwert/Standardabweichung).

Weitergehende Untersuchungen über den Einfluß der Detergenskonzentration wurden jedoch nicht durchgeführt.

Eine 1,5 - fache Erhöhung der Ausbeute durch 1 % Brij 58 wurde von Schmincke und Hausen (1973) berichtet.

4.2 Vorbereitung des Chromatinzentrifugats für chromatographische Folgeschritte

Wie in 3.3 diskutiert, ist es sinnvoll bei Enzymreinigungen vor den chromatographischen einen oder mehrere Fällungsschritte durchzuführen. Ammoniumsulfat (AS), Polyethylenimin (PEI) und Polyethylenglykol (PEG) wurden auch hier untersucht.

4.2.1 PEI Fällung im Chromatinzentrifugat

In der Aufarbeitung von Hodo und Blatti (1977) wird das Chromatinzentrifugat mit 4 µl/ml einer 10 % PEI Lösung gefällt und die RNA Polymerase Aktivität unter Anreicherung aus dem Niederschlag eluiert. Der Versuch dies zu reproduzieren schlug fehl, was an der unterschiedlichen Qualität der verwendeten Polyminlösungen lag.

Hodo u. Blatti (1977) arbeiteten mit einer Polyminlösung von Aldrich Chemical Co. (als 30 % Lösung geliefert, hochviskos, ohne Firmenangabe über den Polymerisationsgrad); sämtliche meine Experimente wurden mit PEI 600 von Serva (M etwa 60 kD) durchgeführt (geliefert als 100 % Reinsubstanz, dünnflüssig).

Mit Aldrich PEI beobachtete ich später das beschriebene Fällungsverhalten.

PEI 600 führt erst bei wesentlich höheren Konzentrationen zu einer vollständigen Fällung der RNA Pol Aktivität.

Abb. 23 zeigt die RNA Polymerase Aktivitäten im Überstand von Fällungen bei unterschiedlichen PEI Konzentrationen. Sowohl die Gesamtaktivität wie Pol A u. C wurden bis 5 µl/ml stimuliert, nahmen darüber erst schnell, dann langsamer bis auf 0 ab.

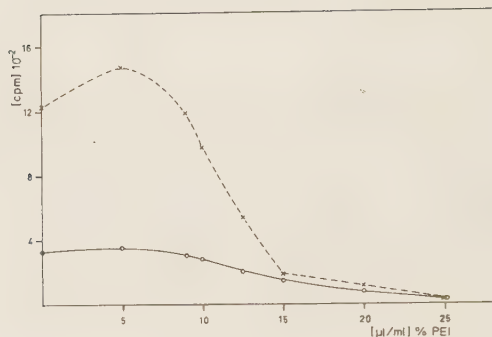


Abb. 23 Fällung von CT RNA Polymerase mit PEI 600

Zu je 10 ml eines Chromatinzentrifugates wurden 0 - 25 µl/ml einer 10 % PEI Lösung (pH 7,9 , HCl) gegeben. Nach 60 min wurde abzentrifugiert (30 min, 30000 rpm, Christ SW40) und die Aktivität im Überstand mit 0 und 2 µg/ml Ama bestimmt.

+-----+ 0 µg/ml Ama
 o-----o 2 µg/ml Ama

Die anfängliche Stimulierung war auch im Chromatinzentrifugat der Rattenleberaufarbeitung gefunden worden .

In 13 durchgeführten Reinigungen wurde dabei eine durchschnittliche Stimulierung von 29 % beobachtet (SD = 21 %).

4.2.2 Ammoniumsulfatfällung

Wegen des günstigen Effektes der PEI Fällung wurden alle Versuche zur AS Fällung an Überständen nach einer PEI Fällung (mit 4 µl/ml) durchgeführt. Mit der AS Fällung sollte eine Konzentrierung der Lösungen bewerkstelligt werden, wozu die PEI Fällung weniger geeignet war (vgl. 3.3.3).

Abb. 24 zeigt die schleppende Abnahme der RNA Polymerase Aktivität im Überstand einer AS Fällungsreihe. Der Versuch das gefällte Enzym aus dem Niederschlag zu gewinnen brachte für Pol B nur schlechte Ausbeuten. Für Pol A + C dagegen betrugen die Ausbeuten teilweise bis 100 %. Da aber Polymerase B isoliert werden sollte, wurde auf weitere Untersuchungen und die Verwendung einer AS Fällung verzichtet.

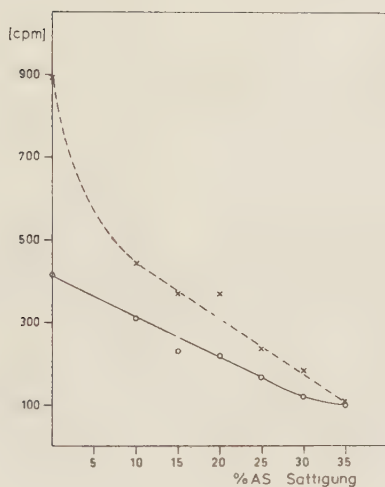


Abb. 24 Fällung von CT RNA Polymerase mit Ammoniumsulfat

Der Überstand einer PEI Fällung wurde in 10 ml Portionen geteilt. Unterschiedliche Mengen gepulverten AS wurden zugegeben und die Lösungen nach 150 min zentrifugiert (30 min, 36000 rpm, Christ SW40). Die pellets wurden in 3 ml Puffer A aufgelöst. Aktivität in Überstand und Niederschlag wurde mit 0 und 2 ug/ml Ama bestimmt. Nur die Aktivitäten im Überstand sind gezeigt.

+-----+ 0 ug/ml Ama

o-----o 2 ug/ml Ama

4.2.3 PEG Fällung

Sämtliche Untersuchungen zur PEG Fällung wurden an Überständen von PEI Fällungen mit 4 ul/ml 10 % PEI 600 (= PEI Überstand) durchgeführt. Tabelle 9 zeigt, daß die Polymerasen schon bei geringen PEG Konzentrationen nicht mehr im Überstand nachweisbar waren. Wie in 3.3.4 erläutert wurde, kann dies sowohl eine Fällung der Enzyme als auch nur eine Inaktivierung der Enzyme im Überstand bedeuten.

Tabelle 9 Fällung von CT RNA Pol mit PEG 6000. Aktivität im Überstand

% PEG	cpm(0)	cpm(2)	A + C	B
0	796/15	440/49	440	356
3	885/12	439/51	439	446
6	425/23	215/1	215	210
9	0	0	0	0

Je 10 ml eines PEI Überstandes wurden mit den angegebenen Mengen an pulverisiertem PEG versetzt (Gewichtsprozent pro Ausgangsvolumen) und nach Zentrifugation (30 min, 36000 rpm, Christ W70) die Aktivität im Überstand mit 0 und 2 ug/ml Ama bestimmt. Die Zahlenpaare bei cpm geben Mittelwert und Standardabweichung aus 2 - 3 Einzelmessungen.

Dagegen gelang es erst nach Fällung mit höheren PEG Konzentrationen (20 - 30 %) das Enzym ohne Aktivitätsverlust aus dem Niederschlag zu eluieren.

Dieser Effekt könnte wie bei der Isolierung der RNA Pol B aus Rattenleber (s. 3.3.2) mit der Existenz eines stimulierenden Faktors erklärt werden, welcher erst bei höheren PEG Konzentrationen gefällt wird.

Tabelle 10 zeigt die Aktivitäten aus den Niederschlägen einer PEG Fällungsreihe.

Tabelle 10 Fällung von CT RNA Polymerase mit PEG 6000. Aktivität im Niederschlag

% PEG 6000	10	15	20	25	30	35
Pol A + C (cpm)	341	433	589	538	523	382
Pol B (cpm)	NT	599	635	704	893	651

Je 20 ml eines PEI Überstandes wurden mit den angegebenen PEG Konzentrationen gefällt (Gewichtsprozent pro Ausgangsvolumen). Nach 60 min wurden je 13 ml abzentrifugiert (60 min, 36000 rpm, Christ SW40), die Niederschläge in 3 ml Puffer A aufgelöst, und die Aktivität nach einer kurzen Zentrifugation in einer Eppendorffzentrifuge mit 0 und 2 ug/ml Ama bestimmt.

Sowohl Pol A + C wie Pol B wiesen mit zunehmender PEG Konzentration ein Maximum der meßbaren Ausbeute im Niederschlag auf. Bei Pol A + C lag dieses bei 15 - 20 %, bei Pol B bei 25 - 30 % PEG. In Experimenten mit unterschiedlicher Fällungsdauer wurde nachgewiesen, daß dies kein kinetischer Effekt war, sondern die Gleichgewichtslage im PEG Zweiphasensystem darstellte. Das unterschiedliche Verhalten von Pol A + C und B wurde durch eine längere Fällungsdauer eher noch

betont.

Tabelle 11 zeigt dies.

Tabelle 11 Fällung von CT RNA Pol mit PEG 6000. Aktivität im Niederschlag . Einfluß der Fällungsdauer.

	15 %		20 %		25 %	
	0,5 h	24 h	0,5 h	24 h	0,5 h	24 h
Pol A + C	812	611	771	565	539	341
Pol B	2350	1008	2423	1726	2639	2152

Je 25 ml eines PEI Überstandes wurden mit 15, 20 und 25 % PEG 6000 (Gewichtsprozent pro Ausgangsvolumen) gefällt. Je eine Hälfte der Ansätze wurde nach 0,5 bzw. 24 h abzentrifugiert (60 min, 30000 rpm, Christ SW40). Die pellets wurden in 3 ml Puffer A aufgelöst und die RNA Pol Aktivität nach kurzer Zentrifugation in einer Eppendorfzentrifuge mit 0 und 2 ug/ml Ama bestimmt.

Auf grund dieser Befunde wurde eine fraktionierte PEG Fällung in die Reinigung aufgenommen. Nach einer Vorfällung mit 3 % PEG, die wegen des deutlich sichtbaren Niederschlages und der Stimulierung der Aktivität schon eine Anreicherung brachte, wurde die PEG Konzentration auf 25 % erhöht. Aus dem Niederschlag kann Pol B zu etwa 90 % gewonnen werden, Pol A u. C unter stärkeren Aktivitätseinbußen.

Die Zusammensetzung des Puffers, der zur Extraktion der Aktivität aus dem 25 % PEG pellet verwendet wurde, bestimmte sowohl Gesamtausbeute, wie Aktivitätsverteilung im Eluat. Ohne zusätzliche Experimente kann aber nicht entschieden werden ob verschiedene Puffer tatsächlich verschiedene Mengen an RNA Polymerase Molekülen eluierten, ob eine Aktivierung der Enzyme oder nur ein Hinüberwirken der Ionenbedingungen ins Testsystem vorlag. In Tabelle 12 ist die Ausbeute und Prozentverteilung nach der Extraktion von 25 % PEG pellets mit verschiedenen Puffern gezeigt. Die Aufarbeitungen, die der Tabelle zugrundeliegen, waren mit Antischaum gemacht worden. Es ist zu beachten, daß Antischaum selbst Ausbeute und Prozentverteilung beeinflusste (s. 4.1).

Tabelle 12 Fällung von CT RNA Pol mit PEG 6000. Aktivität im Niederschlag nach Auflösen in verschiedenen Puffern.

	% Glycerol	(mM) MgCl ₂	(mM) AS	% Ausbeute A + C B		% Verteilung A + C B	
1	10	0	0	63	54	35	65
2	25	0	150	107	114	31	69
3	25	0	500	99	103	32	68
4	30	5	0	50	97	22	78
5	30	5	500	40	94	18	82

Die feine Suspension einer 25 % PEG Fällung wurde in 10 ml Portionen abzentrifugiert (20 min, 30000 rpm, Christ SW40) und die Niederschläge in je 3 ml 50 mM Tris (7,9), 0,1 mM EDTA, 0,5 mM DTE mit den angegebenen Zusätzen suspendiert. Nach 5 h wurden die erhaltenen Suspensionen erneut abzentrifugiert (15 min, 20000 rpm, Eppendorffzentrifuge) und die RNA Pol Aktivität im Überstand mit 0 und 2 ug/ml Ama bestimmt. Die Polymerasen A + C und B machten im PEI Überstand, dem Ausgangsmaterial 35 und 65 % der Gesamtktivität aus.

Es ist deutlich, daß Ionen (Magnesiumchlorid oder Ammoniumsulfat) die Ausbeute an Polymerase B förderten und daß Magnesium sowohl die Ausbeute, wie auch den Prozentanteil von Pol A + C reduzierte.

Die Zeilen 4 und 5 in Tabelle 12 entsprechen Puffer A(0) und A(500).

In späteren Experimenten wurde der Einfluß der Ionenstärke bei der Elution mit Puffern A unterschiedlicher AS Konzentration in Aufarbeitungen ohne Antischaum untersucht. Bei Elution mit Puffer A(0) löste sich stets nur ein kleiner Teil des Niederschlages auf. Die Ausbeute an Pol B betrug dabei 90/14 % (Mittelwert und SD aus 6 Experimenten). Wurde die Ionenstärke des Eluats nach Rezentrifugation auf 300 mM AS erhöht, betrug die Ausbeute 137/43 % (Mittelwert und SD aus 6 Experimenten); d.h. die gemessene Pol B Aktivität erhöhte sich durch Erhöhung der Ionenstärke im Eluat um 50 %. Die Aktivitäten der Polymerasen A u. C verringerten sich dagegen durch Erhöhung der Ionenstärke stark (Pol A auf 33/13 %, Pol C auf 49/11 % ; 4 Experimente).

Durch die Zusammensetzung des Testsystems (30 ul Enzymlösung, 120 ul Testmix) erhöht sich bei der Erhöhung der Ionenstärke in der Enzymlösung von 0 auf 300 mM AS die Salzkonzentration im Testsystem um 60 mM AS. Es ist denkbar, daß die beobachteten Stimulierungen und Inhibitionen der drei Enzyme durch die geänderten ionischen Bedingungen im Test verursacht wurden. Die Salzabhängigkeiten der drei Enzyme sind untersucht (Gissinger et al., 1974; Weil u. Blatti, 1975).

In Hinblick auf die Ergebnisse dieser Autoren ist diese Erklärung jedoch unwahrscheinlich (z.B. liegt das Salzoptimum von Pol C höher als das von Pol B; Weil u. Blatti, 1975), (vgl. auch 4.3.2 : dort wird eine Stimulierung der Aktivität durch Erniedrigung der Ionenstärke beschrieben). Die Aktivitätsprofile sind sehr stark von den Testbedingungen abhängig (Roeder, 1976; Gissinger et al., 1974), so daß zu einer Aufklärung der salzabhängigen Aktivitätsveränderungen, die Profile im hier verwendeten Testsystem neu aufgenommen werden müßten.

4.3 Chromatographie

4.3.1 DEAE Chromatographie nach PEG Fällung

Chromatographie auf DEAE Sephadex wird vielfach als erster chromatographischer Schritt einer RNA Polymerase Reinigung verwendet, da sie zu einer Trennung der Polymerasen A, B und C führen kann (Röder u. Rutter, 1969). In manchen Fällen gelingt die Trennung von Pol B und C nicht (Röder, 1976).

Das ähnliche chromatographische Verhalten der Polymerasen B und C zeigt Abb. 25. Eine Trennung der beiden Polymerasen war auf dem frühen Stadium der Reinigung allerdings auch nicht erwünscht, da die Absicht bestand, auch Pol C weitgehend mitzuisolieren. Eine frühe Trennung der beiden Aktivitäten würde eine Verdoppelung des Reinigungsaufwandes bedeutet haben.

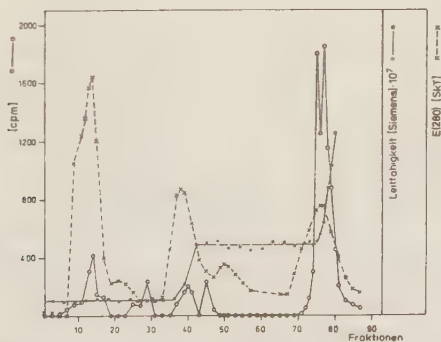


Abb. 25 Chromatographie von PEG gefällter CT RNA Polymerase auf DEAE Sephadex A 25

50 g CT wurden wie unter Methoden beschrieben bis zur PEG Fällung aufgearbeitet. Der Niederschlag wurde in 50 ml Puffer A(0) suspendiert und nach 3 h nochmals abzentrifugiert. Der Extrakt wurde auf eine DEAE A 25 Säule aufgetragen (2,2 x 45 cm, Vol = 171 ml, äquilibriert mit Puffer

A(0), Laufgeschwindigkeit 87 ml/h). Die Säule wurde mit 200 ml Puffer A(0) gewaschen, dann mit 300 ml Puffer A(100) und 250 ml Puffer A(500) eluiert.

Trotz der im Versuch angewandten Stufenelution, die das Enzym in relativ konzentrierter Form lieferte, lag die Gesamtausbeute bei nur 45 %. Das B/C Verhältnis blieb vor und nach dem DEAE Schritt gleich; d.h. die Polymerasen B und C eluierten im Hauptpeak gemeinsam.

Auch ein nachfolgender Schritt auf Heparin Sepharose Cl 4B verlief mit nur 40% Ausbeute, weshalb, wie bei der Isolierung von RNA Pol B aus Rattenleber, versucht wurde, Heparin Sepharose, ohne vorhergehende DEAE Chromatographie, als ersten chromatographischen Schritt zu verwenden.

4.3.2 Heparin Sepharose Chromatographie

Wie auch bei der Isolierung der RNA Pol B aus Rattenleber brachte die Chromatographie auf Heparin Sepharose gute Ergebnisse.

Abb. 26 zeigt Aktivitäts- und E(280) Profil eines Heparin Säulenlaufes.

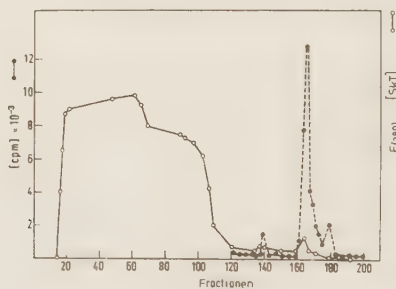


Abb. 26 Heparin Sepharose Chromatographie von CT RNA Polymerase

360 g CT wurden wie im Methodenteil beschrieben aufgearbeitet. Der PEG Extrakt wurde 300 mM an AS gemacht und nach Zentrifugation auf eine Heparin Sepharose Cl 4B Säule aufgetragen (3,5 x 34 cm, Vol = 330 ml, äquilibriert mit Puffer A(300), Auftragesgeschwindigkeit 69 ml/h). Nach Waschen mit 450 ml Puffer A(300) wurde mit Puffer A(500) eluiert (85 ml/h). Alle Lösungen wurden unter Druck mit einer peristaltischen Pumpe aufgetragen.

Nicht das gesamte E(280) Profil muß allerdings Protein darstellen. Nach Auflösen des PEG Niederschlages wurde eine rötlich trübe Lösung erhalten, wobei die Trübung mit großvolumigen Rotoren innerhalb einer Stunde nicht zentrifugierbar war. Die Trübung ging keine Wechselwirkung mit dem Gelmaterial ein und erschien nach dem Auftrag auf die Säule rasch im Ausschlußvolumen.

Die Anreicherung der Polymerase B gegenüber dem primären Chromatinzentrifugat, die weitgehend auf diesem chromatographischen Schritt beruhte war ausgezeichnet, etwa 400-fach. Hohe Flußgeschwindigkeiten begünstigten ein gutes Ergebnis. Die Säulen wurden dazu, wenn nötig, mit einer peristaltischen Pumpe unter Druck betrieben. Da das Rückäquillibrieren auf niedrige Ionenstärken zu einem Quellen der Matrix führte, mußten die Säulen vor jedem Lauf neu gepackt werden. Die Läufe waren gut reproduzierbar, so daß bei gut aufgelösten E(280) Profilen der Aktivitätstest entfallen konnte, was ein schnelles Weiterarbeiten ermöglichte. Dialyse der aktiven Fraktionen gegen Puffer A(0) (Erniedrigung der Ionenstärke) führte zu einem starken Anstieg (oft Verdoppelung) der Pol B Aktivität. Umgekehrt war im aufgelösten PEG Niederschlag bei AS Zugabe (Erhöhung der Ionenstärke) ebenfalls eine Aktivitätssteigerung beobachtet worden (s. 4.2.3). Der stimulierende Effekt von sowohl Erhöhung wie Erniedrigung der AS Konzentration auf verschiedenen Stufen der Reinigung spricht gegen einen einfachen Effekt der Ionenstärke auf das Testsystem.

4.3.3 Sepharose Cl 4B Chromatographie. Heparin ist für den chromatographischen Effekt von Heparin Sepharose Cl 4B verantwortlich.

Die Methode von Hodo und Blatti (1977) enthält einen ungewöhnlichen letzten Reinigungsschritt: das Enzym wird bei 150 mM AS auf eine Agarose A 1,5m Säule gegeben und nach Waschen bei dieser Ionenstärke mit 500 mM AS eluiert. Da auch Sepharose aus Agarose besteht, erschien es notwendig zu kontrollieren ob der chromatographische Effekt der Heparin Sepharose tatsächlich auf Heparin beruhte, oder auf die Eigenschaften der Gelmatrix zurückzuführen war. Die Frage war durch den hohen Preis von Heparin und durch den Aufwand der Gelpräparation von mehr als akademischem Interesse.

Für einen Kontrollversuch wurde Sepharose Cl 4B wie im Methodenteil beschrieben mit Bromcyan (BrCN) aktiviert. Die aktiven Funktionen wurden aber nicht zur Kopplung von Heparin verwendet, sondern mit Ethanolamin gequenchet. Dies ist ein Schritt, der auch bei der normalen Herstellung von Heparin Sepharose stets abschließend angewandt worden war. Abb. 27 zeigt, daß auf diesem Gelmaterial keinerlei Retention von RNA Pol Aktivität erfolgte. Gelpermeationseffekte konnten bei der Durchführung der Versuche nicht

beobachtet werden, da Säulen- und Auftragsvolumen etwa gleich waren.

Der chromatographische Effekt von Heparin Sepharose läßt sich somit mit der Matrix, die durch BrCN Aktivierung und Ethanolamin Quench entsteht, nicht erzielen.

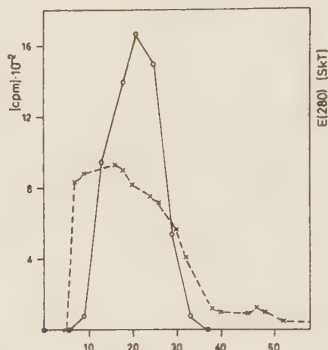


Abb. 27 Chromatographie von CT RNA Polymerase auf aktivierter und gequenchter Sepharose Cl 4B

Herstellung des Gelmaterials : Sepharose Cl 4B wurde mit BrCN aktiviert wie im Methodenteil beschrieben. Statt einer Heparinlösung wurde danach 1 M Ethanolamin zugegeben. Nach den üblichen Waschungen wurde das Gel in Puffer A(300) äquilibriert. Auf eine 40 ml Säule wurden 40 ml Enzymlösung aufgetragen und mit Puffer A(300) und (500) eluiert.

+-----+ E(280) SkT

o-----o RNA Polymerase Aktivität cpm

4.3.4 DEAE A 25 und DE 52 Chromatographie

Nach der guten Anreicherung auf Heparin Sepharose, auf der die Polymerasen A, B und C gemeinsam eluiert wurden, sollte im nächsten Schritt neben einer weiteren Reinigung eine Trennung der Polymerasen A und C von Pol B erfolgen.

In Abschnitt 4.3.1 war auf einer früheren Stufe der Reinigung auf DEAE A 25 mit einem steilen Salzgradienten keine Trennung der Polymerasen B und C beobachtet worden. Abb. 28 zeigt, daß diese Trennung auch nach vorhergegangener Heparin Sepharose Chromatographie und mit einem flacheren AS Gradienten in Puffer A nicht auftrat. Wie zuvor wurde aber auch hier eine Spaltung des Aktivitätspeaks beobachtet.

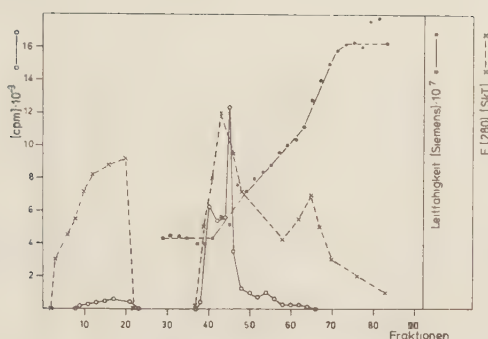


Abb. 28 CT RNA Polymerase auf DEAE A 25

360 g CT wurden wie unter Methoden beschrieben aufgearbeitet. Die aktiven Fraktionen nach der Heparin Sepharose Chromatographie wurden bis 75 mM AS gegen Puffer A dialysiert und das Dialysat (Vol = 212 ml) auf eine DEAE A 25 Sinterglassäule aufgetragen (2 x 10 cm, Vol = 31 ml, äquilibriert mit Puffer A(100), Laufgeschwindigkeit 88 ml/h). Nach 50 ml Puffer A(100) wurde mit einem linearen Gradienten eluiert (40 ml, 100 - 500 mM AS) und mit Puffer A(500) nachgewaschen. In den ersten 23 Fraktionen wurden 170, danach 20 Tropfen pro Fraktion genommen. Die Abszisse der Graphik ist somit nicht volumengetreu.

Der Anteil der drei Polymerasen wurde in den Flanken und in der Mitte dieses peaks bestimmt. Das B/C Verhältnis war aber an allen drei Punkten des peaks etwa konstant, so daß auch bei noch flacherem Gradienten eine B - C Trennung nicht zu erwarten war.

Tabelle 13 zeigt die Aktivitätsverteilung der aufgetragenen Lösung, in drei Fraktionen des Aktivitätspeaks sowie im gepoolten Aktivitätspeak.

Tabelle 13 CT RNA Polymerase auf DEAE A 25. Aktivitätsverteilung

	cpm(0)	cpm(2)	cpm(150)	A	B	C	% A	% B	% C
1	710/30	235/1	33/4	93	484	202	4,5	67,3	28,2
2	6940/257	1783/68	370/18	370	5157	1413	5,3	74,3	20,3
3	12302/32	4239/19	771/78	771	8063	3468	6,3	65,5	28,2
4	1019/113	233/29	61/13	61	786	172	0	77,1	16,9
5	5503/121	1342/138	374/6	374	4161	968	6,8	75,6	17,6

Die Aktivitäten wurden mit 0, 2 und 150 ug/ml Ama bestimmt (Mittelwert und SD aus 2 - 3 Bestimmungen). Daraus wurden in den mittleren drei Spalten der Tabelle die Aktivitäten der drei Polymerasen in cpm errechnet, in den letzten drei Spalten ist die Prozentverteilung angegeben.

Die Zeilen bedeuten : 1) Heparinpool vor Dialyse, 2) - 4) die Fraktionen 40, 45 und 54 aus dem in Abb. 28 gezeigten DEAE Lauf, 5) pool aus den DEAE Fraktionen 39 - 56.

Daß trotz Spaltung des Aktivitätspeaks sich das B/C Verhältnis in den einzelnen Bereichen des peaks sich nur wenig veränderte muß kein chromatographisches Artefakt darstellen. Von vielen Autoren wurden mit flachen Salzgradienten auf DEAE A 25 jeweils zwei oder mehr peaks der Polymerasen A, B und C beobachtet, die sich teilweise gegenseitig überlagerten (z.B. Hossenlopp et al., 1975; Beebe, 1979). Eine solche nicht-artefaktuelle Überlagerung von Subformen der Polymerasen B und C wäre unter gegebenen Pufferbedingungen nicht auflösbar.

Im folgenden wurde daher versucht eine B/C Trennung mit anderen chromatographischen Mitteln zu bewerkstelligen. In den in Abb. 29 gezeigten Versuchen wurde ein Heparinpool gevierteilt und je ein Viertel nach Dialyse gegen Puffer A bzw. Puffer B (= Puffer A ohne Magnesiumchlorid) bei gleicher Laufgeschwindigkeit und gleichem Säulenvolumen auf eine DEAE A 25 bzw. DE 52 Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte diskontinuierlich mit 5 Salzstufen in den jeweiligen Puffern .

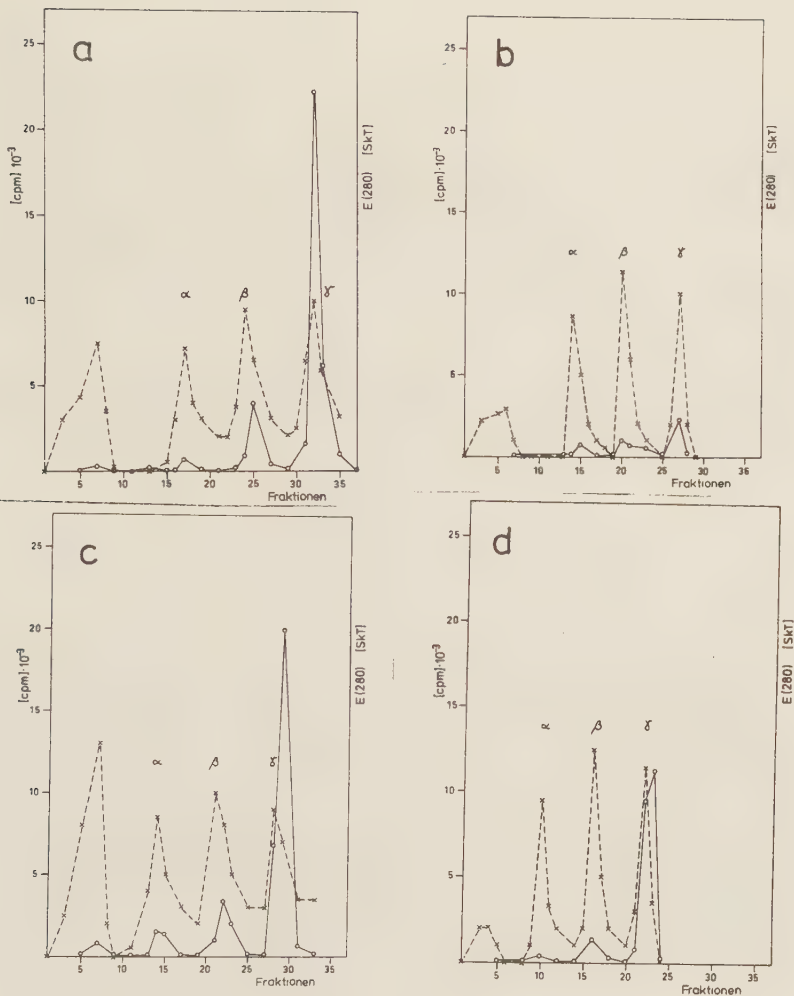


Abb. 29 CT RNA Polymerase auf DEAE Sephadex und DEAE Cellulose

360 g CT wurden wie unter Methoden beschrieben aufgearbeitet. Aktive Fraktionen nach der Heparin Sepharose Chromatographie wurden gepoolt und je eine Hälfte der Lösung gegen Puffer A bzw. Puffer B dialysiert, bis die AS Konzentration auf 50 mM gesunken war. Jeweils die Hälfte dieser Dialysate (39 ml) wurde auf DEAE A 25 bzw. DE 52 Säulen (Säulenvolumen = 10 ml) aufgetragen, die mit Puffer A(50) bzw. B(50) äquilibriert waren. Nach dem Auftrag wurde mit je 15 ml. der Puffer mit den Ionenstärken 50, 100, 150, 300 und 500 mM AS eluiert. Laufgeschwindigkeit 43 ml/h.

Die Fraktionsgröße wurde ab Fraktion 11 (a), 11 (b), 9 (c), 6 (d) von 100 auf 30 Tropfen/Fraktion reduziert. Die Abszisse der vier Abbildungen ist somit nicht volumengetreu.

a) (I) DEAE A 25, Puffer A b) (II) DE 52, Puffer A

c) (III) DEAE A 25, Puffer B d) (IV) DE 52, Puffer B

+----+ $E(280)$ SKT, o—o RNA Polymerase Akt. cpm

Alle vier Läufe hatten ein ähnliches dreigeteiltes Protein- und Aktivitätsprofil (Durchflußpeak und peak α enthielten keine Aktivität).

Tabelle 14 zeigt, wie die Ausbeuten und Anreicherungen der Polymerasen B und C in den einzelnen peaks sowohl vom Mg Gehalt des Puffers wie vom Gelmaterial abhängen.

Nur auf DE 52 (Lauf II und IV) gelang es in einem peak (peak β) Pol C in reiner Form (d.h. frei von Pol B) zu erhalten. Die Abwesenheit von Mg (Lauf IV) erhöhte offensichtlich die Ausbeute an Pol C, so daß unter diesen Chromatographiebedingungen weitere Experimente unternommen wurden.

Die deutliche Veränderung des chromatographischen Verhaltens der Pol C beim Übergang von DEAE Sephadex auf DEAE Cellulose ist auch von anderen Autoren beobachtet worden (s. Röder, 1976), tritt aber nicht bei allen Organismen auf (z.B. Rattenleber : Beebe, 1979).

Tabelle 14 CT RNA Pol auf DEAE Sephadex und DEAE Cellulose

Lauf	DEAE + Mg			DE + Mg			DEAE - Mg			DE - Mg		
	I			II			III			IV		
	B	C	B/C	B	C	B/C	B	C	B/C	B	C	B/C
peak β	5	1	3,5	0	5	0	4	1	3,7	0	7	0
peak γ	22	20	1,1	23	8	2,9	19	16	1,2	18	32	0,6
$\beta + \gamma$	27	21	1,3	23	13	1,7	23	17	1,3	18	39	0,5
tot. Akt.	71	27	2,6	71	27	2,6	65	51	1,2	65	51	1,2
% Ausbeute	38	39		32	49		36	34		28	76	

Die Aktivitäten der Polymerasen B und C in den peaks β und γ sind in units für die vier Testläufe angegeben (I - IV). In der vierten Zeile stehen die aufgetragenen Aktivitäten der zwei Enzyme, wie sie nach Dialyse gegen Puffer A bzw. B bestimmt worden sind. Die fünfte Zeile gibt die darauf bezogenen Ausbeuten nach der Chromatographie. Die Aktivitätswerte für den Lauf IV sind mit einem Faktor 2 korrigiert, da nur die halbe Aktivität aufgetragen worden war.

Durch eine reduzierte relative Flußgeschwindigkeit und eine leichte Änderung der angelegten Salzstufen gelang es auf DE 52 in präparativen Läufen auch Pol B in mehr als 90 % Reinheit (bezogen auf eine Verunreinigung mit Pol A und C) und guten Ausbeuten zu erhalten.

In dem in Abb. 30 dargestellten Säulenlauf war das Verhältnis von A : B : C wie 13,4 : 17,5 : 69,1 (peak β) bzw. 1,3 : 93,0 : 5,7 (peak δ).

Das Arbeiten mit Salzstufen brachte auch hier (vgl. 3.4.3) eine bessere Trennung der Aktivitäten als ein AS Gradient. Der Vorteil einer Stufen- gegenüber einer Gradientenelution wurde auch bei der Reinigung eines anderen multiplen Enzyms, einer Histon Acetyltransferase betont (Harvey u. Lilley,

1976).

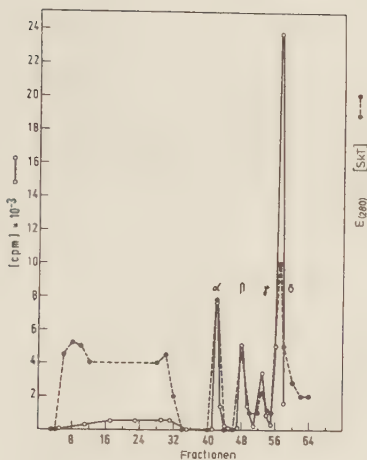


Abb. 30 CT RNA Pol auf DE 52. Präparativer Lauf

360 g CT wurden wie unter Methoden beschrieben aufgearbeitet. Aktive Fraktionen nach Heparin Sepharose Chromatographie wurden gegen Puffer B bis auf 100 mM AS dialysiert. Das Dialysat (187 ml) wurde auf eine DE 52 Säule aufgetragen (Vol = 33 ml, äquilibriert mit Puffer B(100), Laufgeschwindigkeit 50 ml/h).

Mit 65 ml Puffer B(100), 50 ml Puffer B(150), je 30 ml B(175) und B(200) sowie 100 ml B(500) wurde gewaschen und eluiert. Fraktionen zu 7 ml wurden in Plastikgläsern gesammelt.

4.3.5 CM Sephadex Chromatographie

CM Sephadex kann ebenfalls zur Trennung der Polymerasen B und C verwendet werden (s. Röder, 1976). Dabei wird Pol C, nicht aber Pol B bei niedriger Ionenstärke (z.B. in Puffer B(0)) zurückgehalten.

Dies hat den Vorteil gegenüber einer Rechromatographie auf DE 52, daß das Enzym bei niedriger Ionenstärke bleibt und daher ohne nochmalige Dialyse (bei der hohen Reinheit des Enzyms auf dieser Stufe ein verlustreicher Prozess) zur Konzentrierung auf eine kleine DEAE Säule aufgetragen werden kann.

Abb. 31 zeigt den CM 25 Lauf eines DE 52 pools, der bereits stark an Pol B angereichert war (A : B : C = 4 : 85 : 11). Der Durchfluß der CM 25 Säule hatte ein Aktivitätsverhältnis

von 3 : 94 : 3 .

Der peak der bei hoher Ionenstärke eluiert wurde bestand im wesentlichen aus Pol C.

Es wurden keine weiteren Anstrengungen unternommen, die Reinheit (bezogen auf Kontamination durch Pol A und C) von Pol B über 95 % zu erhöhen. Dieser Reinheitsgrad konnte häufig durch sorgfältige DE 52 Chromatographie schon erreicht werden, so daß auf die verlustreiche CM 25 Chromatographie i.A. verzichtet wurde.

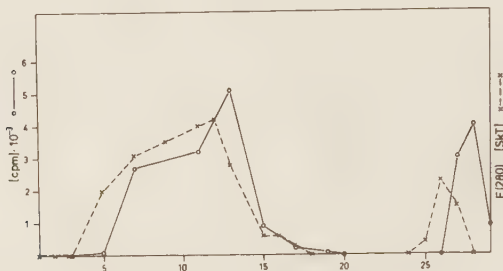


Abb. 31 CT RNA Pol auf CM 25 Sephadex

360 g CT wurden wie unter Methoden bis zur DE 52 Säule aufgearbeitet. Die an Pol B angereicherten Fraktionen wurden gepoolt, gegen Puffer B(0) dialysiert bis die AS Konzentration auf 50 mM gesunken war und auf eine 8 ml CM 25 Säule aufgetragen (äquibriert mit Puffer B(50)). Nach Waschen mit 16 ml Puffer B(50) wurde mit Puffer B(500) eluiert (Laufgeschwindigkeit 20 ml/h).

4.4 Konzentration von verdünnten Enzymlösungen hoher spezifischer Aktivität. Fällung mit PEG

Stark gereinigte Enzymlösungen sind verdünnt labil. Dieser Befund wird in Publikationen über RNA Polymerase Reinigungen häufig mitgeteilt. Dabei fand ich Aktivitätsverluste von RNA Polymerase Lösungen nach DE 52 Chromatographie verstärkt beim Einfrieren (- 30 C), während Lösungen auf früheren Reinigungsstufen (bis nach der Heparin Chromatographie) auch längeres Einfrieren (längster untersuchter Zeitraum : 2 Monate) unbeschadet überstanden.

Im Lauf der Arbeit wurden verschiedene Konzentrationsmethoden untersucht und wegen hoher Verluste verworfen : Druckkonzentration auf PM30 Membran in Minicon Zelle (Fa. Amicon, Oosterhout, Niederlande)
Druckkonzentration auf Centriflow konischen Membranen (Fa. Amicon)

Dialyse gegen konzentrierte PEG Lösungen

Dialyse gegen konzentrierte Glycerollösungen

Bei den beiden Druckkonzentrationsmethoden wurden Aktivitätsverluste in gleicher Weise nach Vorkonzentration von BSA Lösungen gefunden.

Bessere Ergebnisse brachten Stufenelution bei langsamer Flußgeschwindigkeit von kleinen DEAE Säulen bzw. Fällung mit PEG 6000. Verglichen mit der PEG Fällung im PEI Überstand (s. 4.2.3) wurden hier Lösungen gefällt, die eine höhere Konzentration an RNA Polymerase besaßen, aber eine geringere Gesamtproteinkonzentration.

Bei der AS Fällung von Proteinen, unabhängig ob als reine Lösung oder als Proteingemisch (Dixon u. Webb, 1961), aber auch bei der PEG Fällung einzelner Proteine (BSA : Ingham, 1978) verschiebt sich der Mittelpunkt der Fällungskurve (Konzentration an Fällungsmittel, bei der 50 % eines Proteins gefällt sind) mit Verdünnen der Proteinlösung zu höheren Konzentrationen des Fällungsmittels.

Bei Salzfällungen verhalten sich Proteine, die bei der hohen Ionenstärke der Fällung keine Wechselwirkung eingehen, voneinander unabhängig; d.h. die Fällungskurve eines Proteins wird nicht beeinflusst durch die Anwesenheit eines zweiten Proteins (Dixon u. Webb, 1961). Die in Abb. 32 gezeigten Ergebnisse lassen vermuten, daß, anders als bei der AS Fällung, das Fällungsverhalten eines Proteins durch andere Proteine beeinflusst wird.

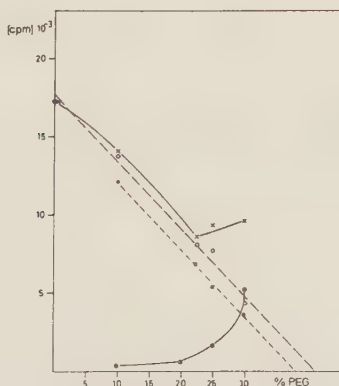


Abb. 32 PEG Fällung von CT RNA Polymerase

CT RNA Polymerase wurde wie unter Methoden beschrieben gereinigt. Eine Lösung des Enzyms (20 u/mg, Gesamtprotein-

konzentration 0,5 mg/ml) wurde in 0,5 ml Portionen mit und ohne γ - Globulin (Cohn II, Sigma, 10 ug/ml) in Eppendorfgläsern mit festem PEG 6000 gefällt. Die Niederschläge wurden nach 90 min abzentrifugiert (30 min, Eppendorfszentrifuge, 20000 rpm) und in 70 μ l Puffer A aufgelöst. Alle Punkte sind Mittelwerte aus 2 Bestimmungen.

- 1) ○ — ○ Aktivität im Überstand (ohne Globulin)
- 2) □ — □ Aktivität im Überstand (mit Globulin)
- 3) ● — ● Aktivität im Niederschlag (ohne Globulin)
- 4) + — + Summe der Kurven 1) und 3)

Eine gegenüber dem PEI Überstand etwa 1000 - fach angereicherte Lösung von Pol B mit aber 20 - fach niedrigerer Gesamtproteinkonzentration (0,5 vs. 10 mg/ml) wurde bei verschiedenen PEG 6000 Konzentrationen gefällt (Abb. 32). Während bei der PEG Fällung aus dem PEI Überstand bereits bei 9 % PEG keine RNA Polymerase Aktivität im Überstand mehr nachweisbar war (s. 4.2.3), wurden hier zur vollständigen Fällung etwa 40 % PEG benötigt. Verhielte sich die RNA Polymerase Aktivität als unabhängiges Protein, so sollte die Fällung eher bei niedrigerer PEG Konzentration stattgefunden haben.

Einen weiteren Hinweis auf den Einfluß von Fremdproteinen auf das Fällungsverhalten von RNA Pol B liefert ebenfalls Abb. 32. Aliquots der Lösung waren vor der Fällung 10 ug/ml an γ - Globulin gemacht worden. Die Fällungskurve verschob sich dadurch einheitlich um 3 % zu niedrigeren PEG Konzentrationen.

Dem Argument, daß hohe Fremdproteinkonzentrationen einfach durch mechanisches Mitfällen das Fällungsverhalten eines Proteins beeinflussen, wurde bereits durch die Gleichgewichtsversuche in 4.2.3 begegnet.

Wie bei den PEG Fällungskurven auf der PEI Reinigungsstufe der CT RNA Polymerase, oder bei der AS Fällungskurve der Reinigung des Rattenenzym, so ergab auch hier die Summationskurve der Aktivitäten aus Überstand und Niederschlag einen U - förmigen Verlauf. Stimulierende Faktoren als mögliche Erklärung sind bereits diskutiert worden (s. 3.3.2). Solche Faktoren sind auch für CT beschrieben worden (Stein u. Hausen, 1970; Benson et al., 1978).

4.5 Zusammenfassende Betrachtung der Reinigung

CT RNA Polymerase B ließ sich nach dem im Methodenteil beschriebenen Verfahren in drei Tagen in hoher proteinchemischer (> 60 % , s.u.) und funktioneller (bezüglich Verunreinigung mit Pol A und C, > 90 %) Reinheit darstellen.

Arbeitsintensiv ist dabei nur der erste Tag der Aufarbeitung. An den folgenden zwei finden Dialysen und Chromatographien statt, die nur sehr wenig persönlichen Zeiteinsatz

erfordern.

Wie weiter unten gezeigt wird, handelt es sich bei den proteinchemischen Verunreinigungen wahrscheinlich um Actin und Tubulin (Smith et al., 1979), so daß einfache chromatographische Verfahren zur weiteren Reinigung denkbar sind.

Der Primärextrakt der beschriebenen Aufarbeitung enthielt nur sehr geringe endonukleolytische und DNA Topoisomerase Aktivitäten (nachgewiesen durch Inkubation mit zirkulärer superhelikaler DNA, s. II, 2.4.4), da diese offenbar bei der geringen Ionenstärke der Extraktion weitgehend chromatin-gebunden blieben.

Die Abwesenheit dieser Aktivitäten ist für Transkriptionsuntersuchungen von großer Bedeutung, da sowohl die Integrität, wie auch die Topologie des templates, das Transkriptionsverhalten stark beeinflussen (vgl. IIIB, 2.1 und Botchan et al., 1973; Hossenlopp et al., 1974; Zimmer u. Milette, 1975;).

Wie bei jeder anderen Extraktionsmethode, so besteht auch bei dem hier beschriebenen Verfahren der Extraktion bei geringer Ionenstärke die Gefahr, daß eine Population von RNA Polymerase Molekülen selektiv herausgelöst wird, die sich möglicherweise im transkriptionellen Verhalten von einer verbleibenden Population unterscheidet.

RNA Polymerasen, die bei niedriger bzw. hoher Ionenstärke extrahiert wurden, können auf DEAE Sephadex ein unterschiedliches Muster an Subformen der Polymerasen A, B und C aufweisen (Röder, 1974; Yu, 1975; Guilfoyle u. Key, 1977; Kellas et al., 1977; Beebe, 1979). Für die RNA Polymerasen aus Rattenleber ist von Beebe (1979) gezeigt worden, daß die Subformen auf nCT DNA ein unterschiedliches Transkriptionsverhalten hinsichtlich der Basenzusammensetzung der transkribierten RNA und hinsichtlich der Rifamycin AF/013 Resistenz aufweisen.

Die Anwendung empfindlicher analytischer Methoden hat gezeigt, daß selbst eine chromatographisch einheitliche Population von RNA Polymerasen in sich stark heterogen sein kann. z.B. beobachteten Johnson et al. (1978) mit Isoelektrischer Fokussierung 9 Formen von Pol B (Sojabohne) (die Möglichkeit chromatographischer Artefakte ist allerdings bei IEF groß, Hare et al., 1978).

Wie bei der Charakterisierung des Enzyms gezeigt wird finden verschiedene Autoren für die CT RNA Polymerase B auf dem SDS Gel jeweils ein anderes Bandenmuster. Die Zusammensetzung des Enzyms ist somit eine Funktion der Aufarbeitung. Wenn die Unterschiede nicht allein in einem unterschiedlichen Grad an Verunreinigung lägen, sondern funktionelle Einheiten des Enzyms betreffen, würde man bei verschiedenen Präparationsmethoden auch verschiedene Eigenschaften des Enzyms erwarten.

Daß Enzyme während gewöhnlicher Reinigungsschritte wichtige funktionelle Bestandteile verlieren, ist bekannt. Das im Zusammenhang wichtigste Beispiel ist die Abtrennung des σ -Faktors von E.coli RNA Polymerase auf Phosphocellulose. σ ist in vivo und vitro für effiziente und spezifische

Initiation der Transkription verantwortlich (Burgess, 1971).

Untersuchungen über den Beitrag einzelner Untereinheiten zur Funktion eukaryontischer RNA Polymerasen liegen bislang kaum vor. Die meisten betreffen Pol A (Cooper u. Quincey, 1979; Iborra et al., 1979; Valenzuela et al., 1978; Mishima et al., 1979; Kellas et al., 1977; Gissinger u. Chambon, 1975). Kranias u. Jungman (1978) fanden, daß eine cAMP - unabhängige Kinase Pol B in einem 25 kD Polypeptid phosphoryliert, was zu einer dreifachen Stimulierung des Enzymes führte. Informationen dieser Art können als Hinweis für die Zugehörigkeit des betroffenen Polypeptids zum Enzym gewertet werden.

Benson et al. (1978) isolierten einige stimulierenden Polypeptide aus CT. Ihr gezielter Einfluß auf Initiation und Elongation (Spindler, 1979), sowie ihre mögliche Assoziation mit kleineren Polypeptiden der gereinigten Pol B, macht auch sie als Untereinheiten wahrscheinlich.

Wie die Tabelle 15 zeigt, wird Pol B während der beschriebenen Reinigungsschritte etwa 6000 - fach bis zu einer spezifischen Aktivität von etwa 65 u/mg angereichert. Die aktiven Fraktionen nach DE 52 Chromatographie wurden für Transkriptionsuntersuchungen ohne vorherige Dialyse eingesetzt.

	Vol (ml)	Prot. (mg/ml)	Aktivität (cpm)			Aktivität (u/ml)			Aktivität (u/mg)			% Verteilung			Ausbau			Anreicherung		
			0	2	150	A	B	C	B	0		A	B	C	A	B	C	B	0	C
Chromatinsentrifugat	1340	9,2	422/25	285/23	150/17	0,131	0,108	0,106	0,011	0,011		38	31	31	100	100	100	1	1	1
PEI-Überstand	1270	ME	533/36	358/2	218/61	0,173	0,138	0,110				41	33	26	125	121	99			
3 x PEG Überstand	1270	ME	612/14	413/24	223/33	0,177	0,157	0,148				37	32	31	129	137	132			
25 x PEG Niederschlag	315	ME	1295/11	795/91	456/97	0,36	0,394	0,267				35	39	26	65	86	59			
AS-Überstand	315	ME	1277/71	375/31	175/45	0,138	0,112	0,158				14	71	16	25	155	35			
Herarin-pool (dial.)	180	0,456	3974/151	1684/202	282/15	0,222	1,807	1,106	3,96	2,42		7	58	35	25	224	140	360	220	
DEAE peak-frkt. 1.	7	0,178	7628/137	6294/207	1025/192	0,809	1,06	4,16		23,3		13	17	70	3	5	20			2118
DEAE peak-frkt. 2.	7	0,266	23043/370	1673/25	304/19	0,24	17,49	1,08	65,8			1	93	6	1	84	6	5981		

Tabelle 15 Reinigung von CT RNA Polymerase B

360 g CT wurden wie unter Methoden beschrieben aufgearbeitet. Die Aktivitäten wurden mit 0, 2 und 150 ug/ml Ama im Standardtest bestimmt. Mittelwerte und SD aus 2 - 3 Bestimmungen sind angegeben (cpm). Die Aktivitäten der Polymerasen A, B und C wurden daraus in u/ml berechnet. Protein wurde mit der Biuretmethode oder nach Hartree bestimmt. Proteinbestimmungen in PEG - und PEI - haltigen Lösungen wurden wegen der angegebenen Schwierigkeiten (s. II,2.2.1) nicht vorgenommen.

Dialyse konnte, wie auch nach Heparin Sepharose Chromatographie beobachtet (4.3.2), bis zu einer Verdoppelung der Aktivität führen. Dadurch verdoppelt sich sowohl Anreicherung wie spezifische Aktivität. Zusammen mit dem gelelektrophoretischen Befund der 65 % Reinheit des Enzyms (s.u.) errechnet sich so eine maximale spezifische Aktivität des Enzyms von 200 u/mg. Dieser Wert steht in Einklang mit publizierten Ergebnissen (Keding u. Chambon, 1972 : 270 u/mg; Hodo u. Blatti, 1977 : 160 u/mg).

Die Aktivitätsausbeuten an Pol B, bezogen auf das Chromatinzentrifugat, lagen zwischen 80 und 100 % . Diese Angabe reflektiert wahrscheinlich nicht die wahren Enzymausbeuten, da während der Reinigung Stimulierungen bis zu 400 % auftraten. Es ist anzunehmen, daß während der Reinigung eine Reihe von inhibierenden Faktoren entfernt werden, so daß Verluste an RNA Polymerase Molekülen durch die Stimulierung des verbleibenden Enzyms ausgeglichen werden. Eine Bestimmung der Molekülzahl während der Reinigung mit markiertem Methyl- γ -amanitin ist möglich (Cochet-Meilhac et al., 1974), wurde aber nicht vorgenommen.

Die im Chromatinzentrifugat erhaltenen Anfangsausbeuten lagen 4 - 10 fach niedriger als bei Keding et al. (1972), Schmincke u. Hausen (1973) oder Hodo u. Blatti (1977). Die Autoren lagern CT in flüssigem Stickstoff oder bei - 70 C. Ich lagerte das Gewebe nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff bei - 30 C. Die Lagerzeit betrug i.A. einige Tage bis wenige Wochen. Die Polymeraseausbeuten sollen durch längeres Lagern bei - 70 C bis zu einem Faktor 5 zunehmen (persönliche Mitteilung von P. Hausen an J. Sonnenbichler). Es ist denkbar, daß bei diesen Temperaturen Endonukleasen noch aktiv sind und die Freisetzung des Enzyms bei späteren Homogenisation des Gewebes bei niedriger Ionenstärke fördern (vgl. Kastern et al., 1979).

Die wesentlich höheren Ausbeuten der hier beschriebenen Reinigung bis zur DE Chromatographie (80 - 100 vs. 5 - 25 %) gleichen den Nachteil der geringeren Anfangsausbeute teilweise aus (Keding u. Chambon, 1972 und Hodo u. Blatti, 1977 : 1000 u/kg CT ; die beschriebene Methode : 300 - 600 u/kg CT).

4.6 Elektrophoretische Charakterisierung des Enzyms

Die spezifische Aktivität der RNA Pol B auf der Stufe der DE 52 Chromatographie von 65 - 130 u/mg ließ noch kein sauberes Enzym erwarten. Es wurde daher nur eine vorläufige Charakterisierung des Enzyms vorgenommen, die Hinweise für weitere Reinigungsschritte geben sollte. Alle Daten, insbesondere die Molmasse der Polypeptide bei der SDS Elektrophorese sind somit keine endgültigen Werte.

Nach Keding u. Chambon (1972) sind auch bei der nativen PAA Elektrophorese der reinen RNA Pol B zwei Banden zu erwarten.

Wie Abb. 33 zeigt, wurden aber auf der Stufe der DE 52 Chromatographie mehr als 2 Banden gefunden. Mit dem Auge waren auf dem gezeigten Gel 4 Banden auszumachen, die im scan nur noch als Schulter aufgelöst wurden. Diese sind in der Abbildung mit Pfeilen gekennzeichnet.

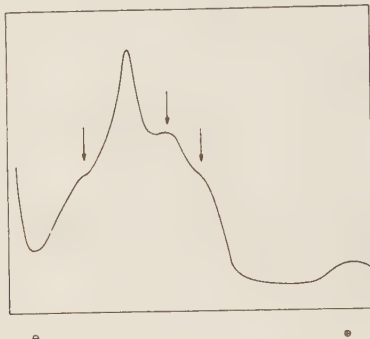


Abb. 33 CT RNA Pol B. Elektrophorese unter nicht denaturierenden Bedingungen

Gele wurden wie im Methodenteil beschrieben hergestellt. Beide Pufferräume enthielten Thioglycolsäure und DTE. Elektrophoresebedingungen, Färben, Entfärben, Vermessen und Planimetrieren der Gele s. Methodenteil. 27 μ g Protein der peak Fraktion eines DEAE Laufes wurden beim gezeigten Gel aufgetragen. Die Probe war zuvor gegen 1/10 Elektrophorespuffer, 40 % Glycerol dialysiert worden. Vor Auftrag wurde Bromphenolblau zu einer Konzentration von 0,05 % zugesetzt.

Das native Gelprofil steht in Einklang mit den Ergebnissen aus der SDS Elektrophorese (Abb. 34a). 12 Banden wurden deutlich aufgelöst. Mit Hilfe der Eichproteine und der halblogarithmischen Auftragung in Abb. 34 b) wurden ihnen Molmassen zugeordnet. Abb. 34c) zeigt einen scan der Gelspalte 6.

Der klare Hintergrund zwischen den Banden, auch bei starker Überladung des Gels, deutet auf eine hohe Reinheit des Enzyms.

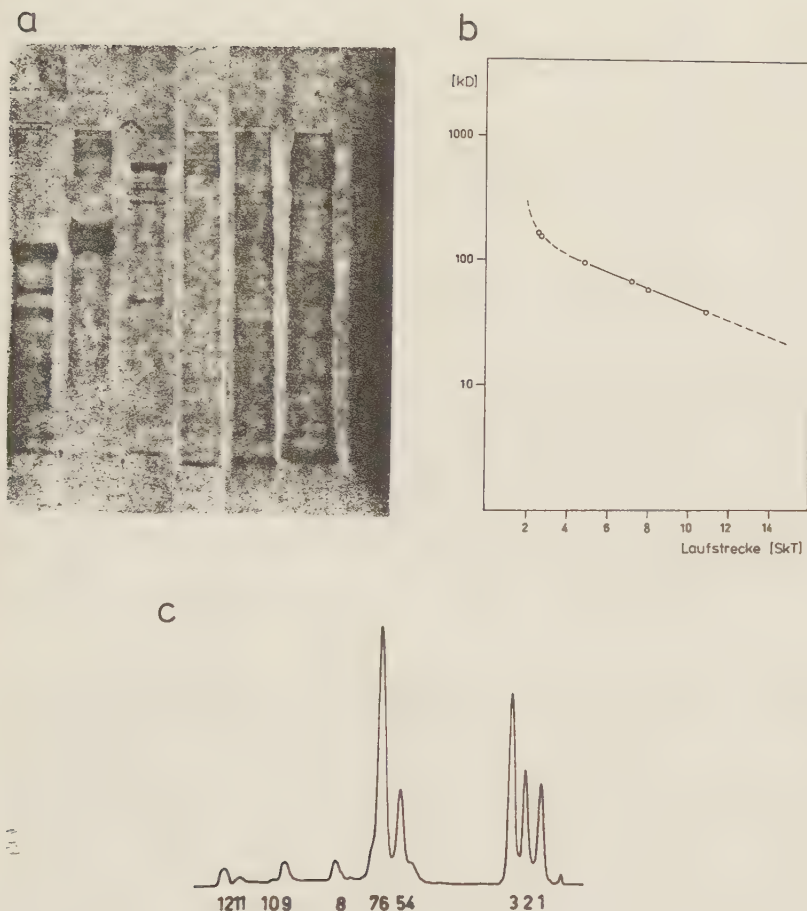


Abb. 34 CT RNA Pol B. SDS Elektrophorese

a) 10 % PAA Gel, Gellauf, Färben und Entfärben wie unter Methoden beschrieben. Die Spalten 1 - 3 enthalten als Markerproteine Catalase (57,5 kD), BSA (67,5 kD), E.coli RNA Pol (α = 39, α = 95, β = 155, β' = 165 kD), 4) Rattenleber RNA Pol B, 5) 37 μ g CT Chromatinzentrifugat, 6) und 7) 66 bzw. 33 μ g CT RNA Pol B (peak Fraktion aus DE 52 Lauf).

b) Eichkurve zur Bestimmung der Molmasse durch SDS Gelelektrophorese

c) Scan eines SDS Geles

In Tabelle 16 sind die Gelspalten 6 und 7 aus Abb. 34 a) quantitativ ausgewertet.

Tabelle 16 SDS Elektrophorese von CT Pol B. Planimetrische Auswertung der Gelscans

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
F/SD	6,3/1,8	9,4/1,7	16,2/1,6	2,0/1,4	9,0/2,7	31,4/0,5	5,4/0,5	3,2/0,5	3,2/0,6	0,8/0,3	0,8/0,2	1,9/0,3
M	212	175	152	54	50	43	40	28	19	10,6	10,3	10,2
F/M	0,030	0,054	0,123	0,038	0,180	0,73	0,135	0,114	0,283	0,075	0,078	0,186
F/M 0,123	0,24	0,44	1,0	0,3	1,47	5,95	1,10	0,95	2,31	0,61	0,64	1,52

Die Gelspalten 6 und 7 aus Abb. 34 a) wurden vermessen wie in Abb. 34 c) beschrieben. Zeile 1 gibt Mittelwert und SD der peak Flächen in % der Gesamtfläche unter den peaks. Die Molmassen M der einzelnen Banden wurden aus Abb. 34 b) ermittelt. Für Bande 1 wurde wegen der Nichtlinearität des gezeigten plots plots ein Mittelwert von 212 kD aus den Arbeiten von Kedinger et al. (1974) und Hodo u. Blatti (1977) angenommen. F/M gibt das relative Molzahlenverhältnis der Polypeptide in den einzelnen peaks. Die F/M Werte sind in der 4. Zeile auf die Molzahl des 3. peaks normiert.

Bande 3 wurde als Bezugspunkt gewählt, weil sie nach Kedinger u. Chambon (1972) den beiden elektrophoretisch und chromatographisch trennbaren Subformen von Pol B, Pol B(I) und Pol B(II), gemeinsam ist. Dagegen gehören nach den Autoren die Banden 1 und 2 nur zu den Subformen B(I) bzw. B(II).

Nimmt man jeweils eine 1 : 1 Stöchiometrie für die beiden großen Banden an (Kedinger et al., 1974), so sollten sich in der 4. Spalte der Tabelle die beiden ersten Werte zu 1 addieren; es ergibt sich nur 0,68, jedoch liegt die Differenz zu 1 im Bereich der Standardabweichung.

Die Polypeptide 5 und 6 machen etwa 35 % der Proteinmasse der Enzympräparation aus. Überraschenderweise waren sie in anderen Aufarbeitungen geringerer spezifischer Aktivität kaum vorhanden.

Wie Spalte 5 der Abb. 34 a) zeigt sind bereits im Chromatizentrifugat zwei Banden gleicher Mobilität deutlich zu erkennen. Es ist daher zu vermuten, daß diese Banden Verunreinigungen des Enzyms darstellen.

Smith et al. (1979) fanden bei der Isolierung von RNA Polymerase B aus *Physarum polycephalum* ein 44 kD Polypeptid, das sie als Actin identifizierten. In der Aufarbeitung von Hodo u. Blatti (1977) ist ebenfalls bis zur letzten Reinigungsstufe ein 44 kD Polypeptid die stärkste Bande. Sein Anteil wird durch Chromatographie auf Biogel A 1,5 m stark reduziert; es ist aber auch noch nach einer nachfolgenden Glycerolgradientenzentrifugation deutlich vorhanden. Wie Spalte 4 in Abb. 34 a) zeigt, befindet sich auch bei

Rattenleber RNA Pol B eine Bande auf gleicher Höhe. Lindberg u. Skoog (1970) isolierten aus CT ein DNase I Inhibitor Protein (M 44 - 49 kD), das etwa 5 - 10 % des gesamten Proteins eines Extraktes bei niedriger Ionenstärke ausmachte. Lazarides u. Lindberg (1974) wiesen nach, daß dieses Protein (seine Molmasse wurde auf 42 kD korrigiert) mit Muskelzellactin identisch ist.

Es ist somit wahrscheinlich, daß auch das 43 kD Polypeptid der hier beschriebenen RNA Pol Aufarbeitung aus Actin besteht.

Die Verunreinigung von nukleären Actinpräparationen mit Tubulin (50 kD) (Douvas et al., 1975) legt ferner nahe, auch die 50 kD Bande als Protein des kontraktile Apparates zu betrachten.

Wenn man die Bande 4 wegen ihres substöchiometrischen Auftretens und die Banden 11 und 12 wegen der möglichen Koinzidenz mit Banden gleicher Laufstrecke im Chromatinzentrifugat nicht zum Enzym zählt, so ergibt sich eine vorläufige Zusammensetzung der RNA Pol B, die in Tabelle 17 mit den Ergebnissen von Ingles (1973), Kedinger et al. (1974) und Hodo u. Blatti (1977) verglichen wird.

Tabelle 17 Struktur der RNA Pol B aus CT. Vergleich mit anderen Autoren

1)	200	170	140		40	30	21												
2)	214	180	140		34	25	20,5		16,5										
3)	210	180	145	44	36	25	20	18,5	16	15	12	11,5							
4)	>200	175	132		40	28	19					10,6							

1) Ingles (1973), 2) Kedinger et al. (1974), 3) Hodo u. Blatti (1977) 4) diese Arbeit (1980). Die Molmassen sind in kD.

Die Übereinstimmung mit den anderen Autoren ist zufriedenstellend und zeigt, daß eine gute Reinigung der RNA Polymerase B auch mit einer Methode, die aus wenigen Schritten besteht und dadurch verlustarm ist, erzielt werden kann. Sowohl die geringe Anfangsausbeute, wie die mögliche Verunreinigung der Enzympräparation mit Proteinen des kontraktile Apparates, bedürfen weiterer Untersuchungen. Diese Fragen wegen der Themenstellung der vorliegenden Arbeit nicht mehr in Angriff genommen.

IIIB Transkriptionsversuche

1. Transkriptionsversuche mit isolierten Rattenleberzellkernen

Vor den eigentlichen Transkriptionsversuchen mit isolierten templates und RNA Polymerasen wurde eine Reihe von Vorversuchen unternommen, die helfen sollten einige Randbedingungen festzulegen. Untersucht wurde der Einfluß der Temperatur, der spezifischen Aktivität und Konzentration von UTP, sowie des Puffersystems auf die Transkription. Weiterhin wurde die Fällbarkeit der Transkriptionsprodukte und der Einfluß der Lagerbedingungen auf die Transkriptionsaktivität der isolierten Zellkerne untersucht. Auf den hier dargestellten Ergebnissen basieren die Bedingungen, unter denen Zellkerne ohne Verlust ihrer Transkriptionsaktivität (wichtig vor allem für die Isolierung der RNA Polymerasen) eingefroren werden konnten, sowie die Wahl von Puffersystem, Temperatur und Fällungsmethode für die späteren Transkriptionsversuche mit Oligonukleosomen, die das eigentliche Thema der Arbeit darstellten.

1.1 Einfluß der Kernkonzentration im Transkriptionsansatz auf die RNA Synthese

Rattenleberzellkerne wurden bei unterschiedlicher Kernkonzentration bis zu 60 min lang mit markiertem UTP inkubiert und die säurefällbare Radioaktivität zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Wie Abb. 35 zeigt, nahm die säurefällbare Aktivität nach 15 oder 30 min ab. Es kann angenommen werden, daß mindestens zwei Prozesse konkurrieren: Einbau von UTP in höhermolekulare RNA und Abbau dieser RNA zu kleineren Bruchstücken. Am Anfang der Kinetik überwog der Einbau.

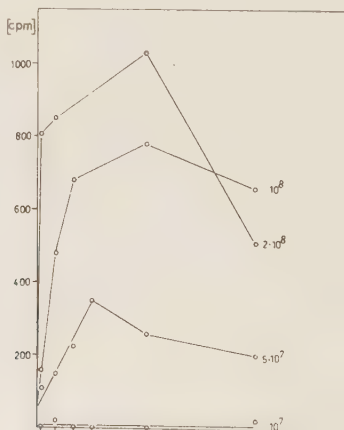


Abb. 35 Endogene Transkriptionsaktivität von Rattenleberzellkernen. Kinetik bei unterschiedlichen Kernkonzentrationen.

Kerne wurden wie unter Methoden beschrieben hergestellt, danach aber in 87 % Glycerol eingefroren. Nach Auftauen wurde die Suspension mit 0,32 M Sucrose, 2 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris, pH 7,0 verdünnt und bei 2500 upm in einer Christ Minifuge abzentrifugiert. Das Kernpellet wurde in Sucrosepuffer resuspendiert. Portionen mit unterschiedlichen Kernzahlen wurden nochmals abzentrifugiert (s.o) und in Transkriptionspuffer aufgenommen (50 mM Tris, 3 mM $MgCl_2$, 2 mM $MnCl_2$, 3 mM DTE, 125 mM NaCl, pH 7,9). Gestartet wurde mit einem gleichen Volumen 1,2 mM ATP, GTP, CTP, 0,6 mM UTP, 10 uCi/ml $[^3H]$ UTP. Inkubiert wurde bei 37 °C. Zu den angegebenen Zeiten wurden je 100 ul zur Bestimmung der säurefällbaren Radioaktivität entnommen. Die bei den einzelnen Kurven angegebenen Werte sind Kernzahlen/ml. Aktivitätsmeßwerte sind Mittelwerte aus drei Bestimmungen.

Wird der 5 min Wert als Maß für die anfängliche Inkorporation genommen so wird deutlich, daß ein linearer Zusammenhang zwischen Inkorporation und Kernkonzentration nur bei höheren Kernkonzentrationen bestand :

ausgehend von einer Kernkonzentration von 2×10^8 /ml wurde 2 mal um einen Faktor 2, dann um einen Faktor 5, insgesamt 20 - fach auf eine Konzentration von 10^7 Kerne/ml verdünnt. Bei diesen Stufen nahm die Transkriptionsaktivität um die Faktoren 2, 3,2 und ∞ ab. Die Kerne wiesen bei einer Konzentration von 10^7 /ml keinen signifikanten Einbau mehr auf.

Eine ähnliche Beobachtung wurde von Lilley und Berendt (1979) gemacht.

Der Befund kann erklärt werden durch die Existenz von Faktoren, die für die endogene Transkription essentiell sind und die in der Lage sind, die Kernmembran leicht zu passieren. Durch das Verdünnen könnte die intranukleäre Konzentration unter einen für die Transkription notwendigen Schwellenwert absinken.

1.2 Einfluß der Temperatur

Abb. 36 zeigt in einer Kinetik den Einfluß der Inkubationstemperatur auf die Menge an säurefällbarer Radioaktivität. Im Gegensatz zu einer Reihe anderer Autoren (z.B. Novello u. Stirpe, 1969; Marzluff et al., 1973; Sarma et al., 1976; Udvardy u. Seifart, 1976) wurde während der ganzen 60 min bei 37 °C eine deutlich höhere Inkorporation gefunden als bei 25 °C. Nach den zitierten Autoren hält der Einbau bei 25 °C wesentlich länger an als bei 37 °C, so daß nach anfänglich höherem Einbau bei 37 °C nach 10 - 15 min die Inkorporation bei 25 °C überwiegt. Im folgenden wird gezeigt, daß die abweichenden Befunde

durch die unterschiedlichen Versuchsbedingungen erklärt werden können.

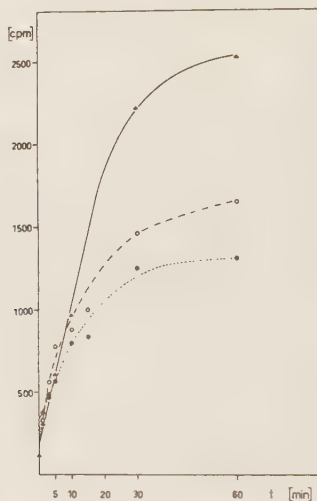


Abb. 36 Endogene Transkriptionsaktivität von Rattenleberzellkernen. Kinetik bei verschiedenen Temperaturen.

Rattenleberzellkerne wurden unter den in Abb. 35 genannten Bedingungen bei einer Kernkonzentration von 10(8)/ml bei 25 oder 37 °C inkubiert. 100 µl Aliquots wurden zu den angegebenen Zeiten mit RNA oder BSA als carrier gefällt. Aktivitätsmeßwerte sind Mittelwerte von drei Bestimmungen.

- △——△ TCA Fällung mit 50 µl 3 mg/ml RNA, 37 °C
- - - -○ TCA Fällung mit 50 µl 3 mg/ml RNA, 25 °C
- - - -● TCA Fällung mit 50 µl 2 mg/ml BSA, 25 °C

1.3 Einfluß der spezifischen Aktivität und Konzentration von $[(3)H]$ UTP

Die in den Abbildungen 35 und 36 dargestellten Versuche waren mit einer geringen spezifischen Aktivität von $[(3)H]$ UTP (16,7 mCi/mMol) und einer relativ hohen UTP Konzentration (0,3 mM) durchgeführt worden. Abb. 37 vergleicht Transkriptionskinetiken, die unter den genannten Bedingungen, sowie bei einer 10-fachen spezifischen Aktivität und einer auf ein zehntel reduzierten UTP Konzentration durchgeführt wurden.

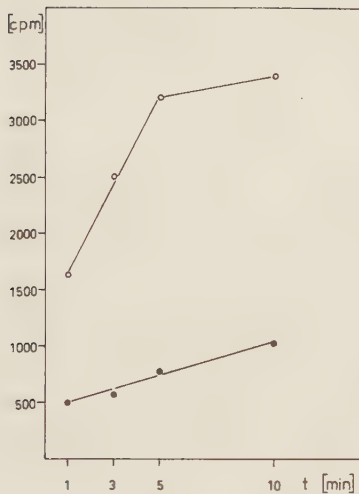


Abb. 37 Endogene Transkriptionsaktivität von Rattenleberzellkernen. Kinetik bei unterschiedlicher Konzentration und spezifischer Aktivität von $[(3)H]$ UTP

untere Kurve : Kernen wurden wie in der Legende zu Abb. 35 beschrieben, bei einer Konzentration von 10(8) Kernen/ml transkribiert.

obere Kurve : die Konzentration an kaltem UTP wurde, bei gleicher Menge an $[(3)H]$ UTP auf ein zehntel reduziert. Alle Werte sind Mittelwerte von 3 Proben.

Die Kinetik bei der höheren Konzentration an kaltem UTP verlief im gezeigten Bereich linear. Bei der geringeren Konzentration flachte die Kurve schon nach 5 min ab. Der Verzehnfachung der spezifischen Aktivität stand nur eine Verdrei- bis Vervielfachung des Einbaus gegenüber. Es ist vorstellbar, daß im Zellkern UTP für andere Bereiche des Metabolismus verwendet (z.B. Synthese von UDP-Glucose) oder einfach abgebaut wird. Dies könnte bei geringer UTP Konzentration zu einer Erschöpfung des precursors führen.

1.4 Puffersysteme für die Transkription

Abb. 38 zeigt einen starken Einfluß des Puffersystems auf die transkriptionelle Aktivität der Zellkerne.

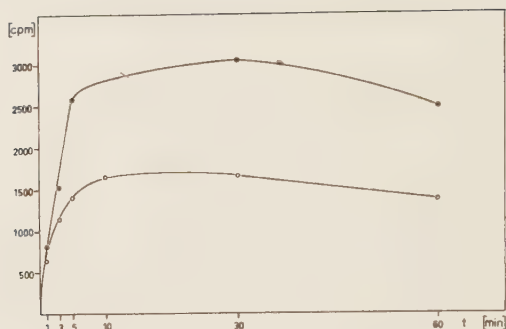


Abb. 38 Endogene Transkriptionsaktivität von Rattenleberzellkernen. Kinetik in Tris und HEPES Puffersystemen

Rattenleberzellkerne wurden wie unter Methoden beschrieben hergestellt, danach aber in 87 % Glycerol bei $-195,8^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Nach dem Auftauen wurde die Suspension mit 2 Volumina 0,32 Sucrosepuffer (s. II,2.1.1) verdünnt und 10 min bei 3000 upm in einer Christ Minifuge abzentrifugiert. Die Kerne wurden zu einer Konzentration von $2 \times 10^8/\text{ml}$ in den angegebenen Puffern aufgenommen und mit gleichen Volumina von 1,2 mM ATP, GTP, CTP, 0,06 mM UTP, 10 uCi/ml $[(3)\text{H}]$ UTP in den entsprechenden Puffern gestartet.

Tris Puffer s. Legende zu Abb. 35; HEPES Puffer s. II,2.4.1 Zu den angegebenen Zeiten wurden je 100 μl zur Bestimmung der säurefällbaren Radioaktivität entnommen. Alle Punkte sind Mittelwerte aus 3 Bestimmungen.

● — HEPES, Tris ○ —

Das HEPES Puffersystem ist einer Vorschrift von Fodor u. Doty (1977) entnommen, die damit eine lang anhaltende, lineare Transkription in Zellkernen aus Retikulozyten erzielen konnten.

In Abschnitt IIIA,2.1 war ein stark inhibierender Einfluß von HEPES auf Micrococcus Nuklease beschrieben worden. Möglicherweise wurde der hier gefundene Anstieg in der Menge an säurefällbarer Radioaktivität durch einen inhibierenden Einfluß auch auf RNasen verursacht. Wegen der Inhibition von Micrococcus Nuklease durch HEPES wurde dieses Puffersystem auch bei der Transkription von Nukleosomen beibehalten.

Nach Carter und Levinger (1977) und Levinger und Carter (1979) besteht die Gefahr, daß bei der Isolierung von Oligonukleosomen, die durch Verdau mit Micrococcus Nuklease gebildet worden sind, das Enzym mitisoliert wird. Die Gegenwart von HEPES im Testsystem könnte einen möglichen weiteren Abbau der Nukleosomen während der Transkription verhindern.

Ein weiterer Vorteil von HEPES gegenüber Tris ist die geringere Temperaturabhängigkeit des pH - Wertes (Bates u. Robinson, 1973; Vega und Bates, 1976; CRC Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, 1976). Dies ist von Bedeutung bei der Bestimmung von kinetischen Aktivierungsparametern (s. 2.9).

1.5 Bedingungen zur Fällung radioaktiver RNA

Tabelle 18 faßt die bei 25 °C erhaltenen Meßwerte von Abb. 36 zusammen und vergleicht die Mengen an säurefällbarer Radioaktivität bei Verwendung von BSA bzw. RNA als carrier. Der background bei gleichzeitiger Zugabe von $[^3\text{H}]$ UTP und TCA zur Kernsuspension war für beide carrier gleich. (90 cpm). Die höheren Ausbeuten mit RNA als carrier liegen möglicherweise an einer geringeren Selbstabsorption bei der Messung der Radioaktivität (vgl. Dynan et al., 1977).

Tabelle 18 Säurefällbare Radioaktivität mit BSA und RNA carriern

[t]	BSA	RNA	RNA - BSA
1	375/150	330/90	- 45
3	469/60	562/120	93
5	565/100	791/130	226
10	796/100	882/120	86
15	836/60	996/150	160
30	1274/80	1460/110	213
60	1511/60	1646/30	135

Rattenleberzellkerne wurden bei 25 °C in Tris Puffer (s. Abb. 35) transkribiert. 100 µl Aliquots wurden zu den angegebenen Zeiwerten [min] in je 50 µl eiskalte BSA (2 mg/ml) bzw. RNA (3 mg/ml) Lösungen einpipettiert und wie üblich mit TCA gefällt und filtriert.

Tabelle 19 zeigt, daß erwartungsgemäß kein signifikanter Einfluß des TCA Fällungsvolumens auf die cpm Ausbeute bestand.

Tabelle 19 Einfluß des TCA Fällungsvolumens auf die Radioaktivitätsausbeute.

Volumen	1	2	4	8	10
cpm	733/100	849/120	792/300	776/120	678/130

Rattenleberzellkernen wurden unter den Bedingungen von Abb. 35 bei einer Konzentration von 10(8) Kernen/ml 10 min inkubiert und mit den angegebenen Volumina [ml] an 10 % TCA, 0,02 M Natriumpyrophosphat sowie RNA als carrier gefällt. Nach 10 min bei 0 °C wurde wie üblich abgesaut (s.

II,2.4.1). Mittelwerte und Fehlergrenzen aus je drei Bestimmungen sind angegeben.

Die Zählausbeute lag bei Filtration über Glasfaserfilter (Whatman GF/C) bei nur 70 % gegenüber der Verwendung von Nitrocellulosefiltern (Sartorius, SM 11305) (dieser Wert wurde mit gereinigter Polymerase B, nicht mit Zellkernen bestimmt).

1.6 Methoden der Kernlagerung

Rattenleberzellkerne wurden nach der Standardmethode isoliert (s. II,2.1.1) und das pellet nach der Zentrifugation durch 2,2 M Sucrose entweder im Einfrierpuffer nach Fodor und Doty (1977) oder in 0,32 M Sucrosepuffer aufgenommen (s. II,2.1.1). Kerne, die im glycerolhaltigen Einfrierpuffer suspendiert worden waren, wiesen bei anschließender Transkription über den gesamten Zeitraum der Kinetik (Abb. 39) eine doppelt so hohe Inkorporation in säurefällbare Radioaktivität auf.

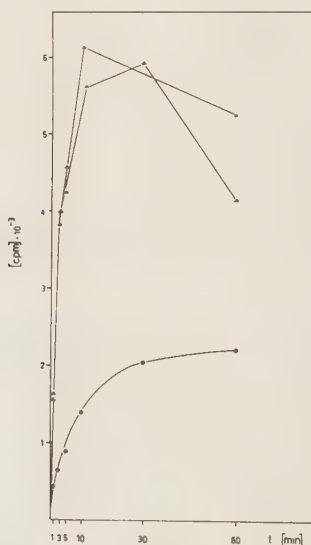


Abb. 39 Endogene Transkriptionsaktivität von Rattenleberzellkernen. Einfluß der Lagerungsbedingungen

Rattenleberzellkerne wurden nach der Standardmethode isoliert und das pellet nach der Zentrifugation durch 2,2 M

Sucrose entweder in Einfrierpuffer oder in 0,32 M Sucrosepuffer (s. II,2.1.1) aufgenommen. Nach 10 min bei 0 °C wurde die Suspension abzentrifugiert (15 min, 3000 udm, Christ Minifuge) und bei einer Konzentration von 5×10^7 Kernen/ml in HEPES Puffer transkribiert (hohe spezifische $[(3)H]$ UTP Aktivität, s. Abb. 37). Ein Teil der Kerne in Einfrierpuffer wurde über Nacht bei - 195,8 °C eingefroren und am nächsten Tag unter den gleichen Bedingungen transkribiert.

- ————— ● Sucrosepuffer
- ▲ ————— ▲ Einfrierpuffer ohne Einfrieren
- ▲ ————— ▲ Einfrierpuffer mit Einfrieren

Zwei Erklärungsmöglichkeiten für die höhere Transkriptionsaktivität der Kerne bei Aufbewahrung im glycerolhaltigen Puffer seien hier angeführt :

1. die geringere Viskosität von 0,32 M Sucrose gegenüber 25 % Glycerol erleichtert die Diffusion von Faktoren, die für die Transkription notwendig sind, z.B. auch der RNA Polymerasen selbst (s. IIIA,3.5).
2. der glycerolhaltige Puffer übt einen stimulierenden Einfluß auf die Transkription oder einen inhibierenden auf RNasen aus. In der Literatur sind sowohl inhibierende (Blair,1977) wie stimulierende (Buss u. Stalter,1978) Einflüsse von Glycerol auf RNA Polymerase beschrieben worden.

Abb. 39 zeigt auch, daß das Einfrieren im Einfrierpuffer ohne jeden meßbaren Aktivitätsverlust der Kerne, im gezeigten Beispiel sogar mit leichter Stimulierung verlief.

2. Transkription von Nukleosomen und nukleosomaler DNA

2.1 Oligonukleosomen als Modellsystem für Chromatintranskription

Der Begriff "Oligonukleosomen", wie er in der vorliegenden Arbeit verwendet wird, bezeichnet das Deoxyribonukleoproteinmaterial (DNP), das durch Verdau von Zellkernen mit *Micrococcus* Nuklease erhalten und bei der Zentrifugation über Sucrosegradienten im Bereich von 11 - 32 s fraktioniert werden kann (s. IIIA,2).

Die beschriebene Fraktionierungsmethode ergibt eine homologe Serie von Oligonukleosomen $n(i)$ mit $1 \leq i \leq 8$. Die Abkürzungen $n(i)$ und $D(i)$ werden hier und im folgenden verwendet, um Nukleosomen und die daraus extrahierte DNA zu bezeichnen. Der nukleosomale Längenindex i besagt, daß die in den Molekülen enthaltene DNA ein i - faches von etwa 200 bp beträgt.

Als repetitive Grundeinheit dieser Oligomere kann das Mononukleosom, bestehend aus einem Oktamer der vier core Histone (H2A, H2B, H3, H4) und 200 bp DNA, betrachtet werden.

Strukturelle Aspekte des Nukleosoms, sowie seiner Verknüpfung zu höheren Strukturen, sind in den in der Einleitung zitierten reviews gut dokumentiert, so daß auf Details hier nicht eingegangen zu werden braucht.

Noch mehr als bei Oligonukleosomen ist es bei dem Begriff des Chromatins unumgänglich, eine operationale Definition zu gebrauchen: als Chromatin wird bezeichnet, was als Produkt einer Chromatinpräparation entsteht. Eine häufig angewandte Methode zur Darstellung von Chromatin ist die Lyse von Zellkernen in Puffern niedriger Ionenstärke oder in Wasser. Zur Löslichmachung des so gebildeten, oft gallertigen Materials, wird dieses i.A. mechanisch geschert. Lösliches Chromatin dieser Machart bildete das Ausgangsmaterial für sehr viele Untersuchungen, denen aber nach neueren Ergebnissen, insbesondere was Experimente zur Spezifität der Chromatintranskription angeht, mit Skepsis zu begegnen ist. Im folgenden werden einige Punkte aufgezählt, die es angeraten sein lassen bei Untersuchungen zur Chromatintranskription kein "Chromatin" zu verwenden.

1. Schlechte Vergleichbarkeit von Chromatinpräparationen. DePomerai et al. (1974) verglichen 6 verschiedene Chromatinpräparationsmethoden. Sowohl die Stöchiometrie der Chromatine wie auch ein funktionelles Merkmal, die Salzabhängigkeit der template Aktivität mit endogenen und exogenen RNA Polymerasen unterschieden sich für die verschiedenen Präparate deutlich.

2. Scherkräfte zerstören die Nukleosomenstruktur (Woll et al., 1975).

3. Durch die mechanische Behandlung von Chromatin werden in unkontrollierter Weise Einzel- und Doppelstrangbrüche in die template DNA eingeführt. Solche Fehlstellen in der DNA führen in Abhängigkeit von ihrer Struktur, von der verwendeten RNA Polymerase, vom Enzym/template Verhältnis, sowie von anderen Transkriptionsparametern teils zu einer Stimulierung teils zu einer Inhibition der Transkription (Vogt, 1969; Hinkle et al., 1972a; Pays u. Ronnse, 1973; Butterworth et al., 1973; Flint et al., 1974; Dezelee et al., 1974; Dreyer u. Hausen, 1976; Dynan u. Burgess, 1979). Die Aussagen der Autoren sind teilweise widersprüchlich.

4. Geschertes Chromatin kann freie DNA enthalten (Varshavsky et al., 1974, 1976).

5. Von mehreren Autoren wurde in Zellkernen und Chromatin bis zu 2 % der Gesamt DNA als Einzelstrang DNA gefunden (Henson, 1978; Leibovitch et al., 1979; Bjursell et al., 1979; Stewart et al., 1979). Fujimoto et al. (1979) fanden, daß durch Einzelstrang-spezifische Nukleasen aus Zellkernen Fragmente mit 8 - 80 Nukleosomen freigesetzt wurden. Nach Palter u. Alberts (1979) und Palter et al. (1979) kann auch Einzelstrang DNA nukleosomal vorliegen. Levy und Simpson (1973) konnten dagegen mit immunologischen Methoden keine Einzelstrang DNA in Chromatin nachweisen. Sowohl freie Doppelstrang- wie Einzelstrang DNA werden verglichen mit DNP wesentlich besser transkribiert (Bonner et al., 1968; Chambon et al., 1974). Ihre Anwesenheit in einer Chromatinpräparation beinhaltet die Gefahr, daß nur sie, nicht aber das eigentliche Chromatin transkribiert werden.

6. Chromatin enthält RNA, die bei E. coli RNA Polymerase sowohl als template, primer und inhibitor dienen kann (Augenlicht, 1978; Pederson u. Bhorjee, 1979; Kharchenko u. Tsyplov, 1979).

Verschiedene Systeme, die es gestatten, den Einfluß von Nukleosomen auf die Transkription zu untersuchen und die die oben aufgezählten Nachteile von Chromatin teilweise umgehen, sind denkbar und wurden in der Literatur auch bereits beschrieben.

1. Cirkuläres Chromatin ("Minichromosomen")
 - a) ohne endogene Polymeraseaktivität
 - b) als endogener Transkriptionskomplex
 - c) mit rekonstituierten Nukleosomen
2. Lineares Chromatin (Oligonukleosomen)
 - a) ohne endogene Polymeraseaktivität
 - b) als endogener Transkriptionskomplex
 - c) mit rekonstituierten Nukleosomen

Die DNA der Papovaviren (SV 40, Polyoma, BK, JC) liegt sowohl in der aktiven Form des Virus, wie im verpackten Virion, in der Form eines Minichromosoms vor (im Virion wahrscheinlich ohne Histon H1). Die Verwendung von Minichromosomen für Transkriptionsuntersuchungen bietet einige große Vorteile :

1) das Transkriptionsverhalten der freien DNA's in ihren verschiedenen topologischen Formen (FI, FI(r), FII, FIII) ist für verschiedene Polymerasen untersucht (SV 40 : Mandel u. Chambon, 1974a,b; Saragosti et al., 1979; Polyoma : Lescure et al., 1978a,b; Monjardino u. James, 1978)

2) die Topologie des templates (FI), sowie das transkribierende Enzym in vivo (Polymerase B) sind bekannt

3) die Genome sind sequenziert (Yang u. Wu, 1979; Seif et al., 1979).

Sowohl das SV 40 (Cremisi et al., 1977; Meneguzzi et al., 1979) wie das BK Minichromosom (Meneguzzi et al., 1978) wurden in vitro transkribiert. Als nachteilig erwies sich dabei die geringe Initiationsfähigkeit von RNA Polymerasen auf Minichromosomen, wenn diese das volle Komplement an Nukleosomen (20 - 25) aufwiesen (Wasylyk u. Chambon, 1979; Wasylyk et al., 1979). Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, wurde in anderen Versuchen mit Minichromosomen entweder mit endogenen Transkriptionskomplexen gearbeitet, die etwa 1 % des minichromosomalen Materials ausmachen (Shani et al., 1977; Brooks u. Green, 1977; Green u. Brooks, 1977; Gariglio et al., 1979; Danglot et al., 1979) oder es wurde von Rekonstituten mit einer geringeren Zahl von Nukleosomen ausgegangen (Mathis et al., 1978; Wasylyk u. Chambon, 1979, 1980; Wasylyk et al., 1979).

Das Arbeiten mit Rekonstituten hat den Nachteil, daß die Präparationen einen hohen Anteil an nackter DNA enthalten (8 - 18 % , Wasylyk et al., 1979). Der Anteil an nackter DNA entspricht etwa der relativen template Aktivität des Rekonstituts gegenüber freier FI DNA. Es muß daher der Beweis erbracht werden, daß die Transkription bei einer solchen Präparation nicht ausschließlich von der nackten DNA erfolgte. Ferner hängt die Relevanz der Ergebnisse ab von der Nativität des rekonstituierten Materials. Da noch keine Tests auf die Funktionalität von Nukleosomen existieren, müssen die Ergebnisse unter diesen Einschränkungen betrachtet werden.

Untersuchungen an linearen Chromatinfragmenten sind in geringerer Zahl vorgenommen worden.

Tata und Baker (1978) sowie Lohr und Ide (1979) untersuchten endogene Transkriptionskomplexe, Williamson und Fellenfeld (1978) ein Histon - Rekonstitut auf T7 DNA. Transkriptionsversuche an Oligonukleosomen mit exogenen RNA Polymerasen, meist mit Schwergewicht auf Mononukleosomen, beschrieben Bustin (1978), Shaw et al. (1978), Ord u. Stocken (1978) sowie Lilley et al. (1979).

Eine Reihe von Gründen lassen Oligonukleosomen, insbesondere homologe Serien davon, als template für Transkriptionsuntersuchungen geeignet erscheinen :

1. die schonende Isolierungsmethode läßt eine hohe Nativität erwarten.

2. die DNA Enden weisen bei den meisten Molekülen die gleiche Struktur (nicht Sequenz) auf, die durch das Schnittverhalten der Micrococcus Nuklease bedingt ist. (Eine andere Endstruktur kann bei den DNA Fragmenten vorliegen, die durch die Wirkung der Ca,Mg-abhängigen Endonuklease entstanden sind, s. IIIA,2.2).

3. DNA in Oligonukleosomen enthält keine nicks (Lawrence et al.,1976; Weischet et al.,1979).

4. Oligonukleosomen nach der beschriebenen Präparationsmethode enthalten keine freie DNA (Lewis,1977; s. IIIA, 2.4.2).

5. Isolierte (Oligo)nukleosomen weisen ein biochemisches Verhalten auf, wie es für intaktes Chromatin in Zellkernen charakteristisch ist

: Isolierte Oligonukleosomen zeigen die gleiche Abhängigkeit des DNase II Verdauemusters von der Ionenstärke wie Zellkerne (Altenburger et al.,1976).

: Der in Zellkernen beobachtete präferentielle Abbau aktiver Gensequenzen durch Micrococcus Nuklease kann auch nach Fragmentierung des Chromatins zu Oligonukleosomen beobachtet werden (Bellard et al., 1978).

: Das crosslinking Muster von H1 mit core Histonen (Bonner u. Stedman,1979; Boulikas et al.,1980), sowie von core Histonen untereinander (Carter et al.,1980) bleibt vor und nach der Nukleolyse von Zellkernen gleich.

: Die erhöhte DNase I Empfindlichkeit transkriptionell aktiver Sequenzen wurde auch bei Mononukleosomen (Weintraub u. Groudine,1976; Giri u. Gorovsky,1980) und bei Oligonukleosomen (Dimitriadis u. Tata,1980) gefunden. Vgl. aber Garel und Axel (1976).

6. physikalisch-chemische und biochemische Eigenschaften von Oligonukleosomen konvergieren in einer homologen Reihe mit wachsender Kettenlänge gegen einen für Chromatin charakteristischen Grenzwert. Oligonukleosomen sind mit wachsender Kettenlänge zunehmend in der Lage höhere Organisationsformen einzunehmen. Dies wurde an den folgenden Meßgrößen gefunden :

: DNA Schmelztemperatur. Sie steigt bei Nukleosomen mit zunehmender Kettenlänge (Lawrence et al.,1976; Mandel u. Fasman,1976; Lewis,1977).

: Bindungsverhalten gegenüber Ethidiumbromid. $n(i)$ mit $i > 5$ notwendig für die Ausbildung eines chromatinartigen Bindungsverhaltens (Lawrence et al.,1976).

: Elektrische Doppelbrechung. Mit zunehmender Kettenlänge bildet sich eine helikale Überstruktur aus, die bei $i = 6$ eine volle Windung erreicht (Marion u. Roux,1978).

: Endogene Transkriptionskomplexe werden nur bei $i > 6$ gefunden (Tata u. Baker, 1978).
 : Komplexe mit Poly-ADPRibose Polymerase erreichen ihre maximale Aktivität bei $i > 8$ (Butt et al., 1978, 1979).

7. Oligonukleosomen sind kein in vitro Artefakt. Das Chromatin im Makronukleus des Ciliaten *Stylonychia mytilus* besteht aus Nukleosomenketten mit $3 < i < 70$, mit einer mittleren Kettenlänge von 18 (Lipps et al., 1978). Lipps und Steinbrück (1978) zeigten, daß dies nicht die Folge eines unspezifischen Abbaus der makronuklearen DNA ist.

Die angeführten Punkte fundieren die Annahme, daß die mit Oligonukleosomen gewonnenen Ergebnisse und Erkenntnisse auch Relevanz für native und intaktere Organisationsformen des eukaryontischen Genoms haben.

2.2 Relative template Effizienz von Oligonukleosomen

Seit den frühesten Untersuchungen zur Transkription von Chromatin ist unabhängig von der verwendeten RNA Polymerase eine Beobachtung immer wieder gemacht worden: Chromatin hat verglichen mit nackter DNA eine geringe template Aktivität (Bonner et al., 1968; Cedar u. Felsenfeld, 1973; Cedar, 1975).

Template Aktivität oder Effizienz sei definiert als die Fähigkeit von DNA oder Chromatin, die template - abhängige Synthese von RNA durch DNA - abhängige RNA Polymerase zu fördern.

Insbesondere bei der Transkription von Chromatin oder bei der Verwendung nur partiell gereinigter RNA Polymerasen besteht die Gefahr von Nebenreaktionen, die eine DNA - abhängige RNA Synthese vortäuschen.

: Kinasereaktionen bei Verwendung von γ -markiertem $[(32)P]$ Nukleosidtriphosphat (Cedar u. Felsenfeld, 1973; Cedar, 1975; Spindler, 1979)

: template-unabhängige Inkorporation bei geringen template Konzentrationen (Cremisi et al., 1977)

: terminale Transferase Aktivitäten in partiell gereinigten RNA Polymerase Präparationen (Wittig und Wittig, 1978)

Die artefaktuelle Inkorporation von $[(3)H]$ UMP in säurefällbares Material lag bei der Transkription von Nukleosomen stets nur knapp über dem background, stellte somit keinen Störfaktor dar.

Die relative template Effizienz eines Oligonukleosoms $n(i)$ gibt das Verhältnis der Einbauraten auf $n(i)$ zu der Einbauraten auf der aus $n(i)$ extrahierten DNA $D(i)$, wobei beide templates unter identischen Bedingungen transkribiert werden.

Für Chromatin wurde in der Literatur i.A. eine relative template Effizienz von 0 - 30 % gefunden. Sehr niedrige Werte sind dabei wahrscheinlich auf einen hohen RNase Gehalt

des Chromatins zurückzuführen (Bonner et al., 1968).

Abb. 40a zeigt die relative template Effizienz (in der Abb. reziprok als $D(i)/n(i)$ aufgetragen) verschiedener $n(i)$ bei Transkription durch Pol B bzw. E. coli RNA Polymerase in Abhängigkeit von der template Konzentration. Reinitiation war unter den Versuchsbedingungen möglich.

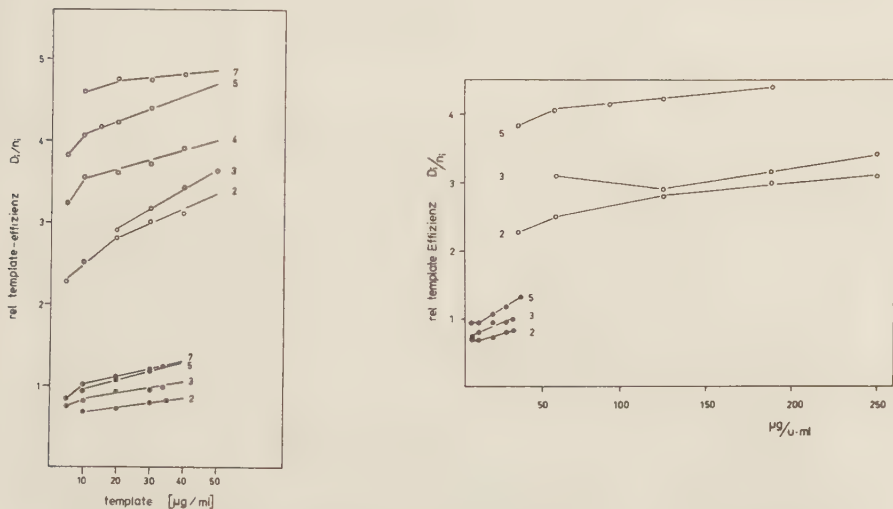


Abb. 40 Relative template Effizienz von Oligonukleosomen mit E. coli und CT RNA Polymerase

Oligonukleosomen, bzw. daraus extrahierte DNA, wurden bei verschiedenen template Konzentrationen (die Abszisse gibt die Ausgangskonzentrationen) mit 1,25 u E. coli Pol in Testsystem 1, bzw. mit 0,16 u Pol B in Testsystem 2, 10 min bei 37 °C transkribiert. Die Salzkonzentration in Testsystem 1 war 150 mM KCl, in Testsystem 2 44 mM AS. Nukleosomen und DNA waren in 0,2 mM EDTA, 1 mM NaCl.

a) relative template Effizienz in Abhängigkeit von der Ausgangstemplatekonzentration

b) wie a), aber mit auf die eingesetzte Enzymaktivität normierten template Konzentrationen.

Alle Primärdaten sind Mittelwerte aus 2 - 3 Einzelbestimmungen

- —● E. coli Pol
- —○ CT Pol B

Zwei wichtige Befunde lassen sich der Abbildung entnehmen :

1. die relative template Effizienz hängt ab von i. Mit zunehmender Kettenlänge werden Nukleosomen relativ schlechter transkribiert. Heptanukleosomen haben mit Pol B nur noch etwa 22 % der template Aktivität von D(7). Dies entspricht einem Wert wie er in der Literatur für typische Chromatinpräparationen angegeben wird. Die in 2.1 erwähnte Konvergenz der Eigenschaften einer homologen Serie von Oligonukleosomen auf einen Chromatingrenzwert wurde somit auch für das hier beschriebene Transkriptionsverhalten beobachtet.

2. die relative template Effizienz sinkt mit steigender template Konzentration.

In Abb. 40a weisen Oligonukleosomen mit E. coli RNA Polymerase eine wesentlich höhere relative template Effizienz ($n(i)/D(i)$) auf als mit Pol B. Die Versuche mit E. coli Polymerase wurden aber, verglichen mit Pol B, mit der achtfachen Enzymaktivität vorgenommen. Wird die Abszisse in Abb. 40a auf die eingesetzte Enzymaktivität normiert so ergibt sich die Darstellung von Abb. 40b. Aus dem schmalen Bereich, in dem die template/Polymerase Verhältnisse für die beiden Enzyme in der Darstellung überlappen, ist jedoch ersichtlich, daß der große Unterschied in der relativen template Effizienz für die beiden Polymerasen auch existiert, wenn beide Enzyme beim gleichen T/P Verhältnis getestet werden.

Unterschiede im Verhalten beider Polymerasen wurden in der Literatur auch bei der Transkription von Chromatin gefunden. Pol B aus Kalbsthymus habe auf Chromatin 20 - 30 mal weniger Initiationsstellen als E. coli RNA Polymerase. Während beim E. coli Enzym die Zahl der Bindungsstellen mit der Zahl der Initiationsstellen übereinstimme, habe Pol B 10 mal weniger Initiations- als Bindungsstellen (Cedar u. Felsenfeld, 1973; Cedar, 1975). Shaw et al. (1978), die ebenfalls die relative template Effizienz von $n(i)$ in Abhängigkeit von der Kettenlänge untersuchten, erhielten Ergebnisse, die den hier dargestellten widersprechen. In ihrem System sank die relative template Effizienz der Nukleosomen von $n(1)$ zu $n(4)$ von 10 auf 2 %. Die Autoren bezogen ihre Werte allerdings auf einen einheitlichen DNA Standard und nicht auf die jeweils entsprechenden DNA Fragmente. Die unterschiedlichen DNA Referenzen können zwar die niedrigere template Effizienz, nicht aber den gegenläufigen Trend in den Versuchen von Shaw et al. (1978) erklären. Neben leicht unterschiedlichen Pufferbedingungen arbeiteten Shaw et al. (1978) bei einem wesentlich niedrigerem T/P Verhältnis von 1,2 $\mu\text{g}/\mu\text{ml}$.

2.3 Transkriptionskinetik unter Reinitiationsbedingungen

Abb. 41 zeigt die Transkriptionskinetik von n(8) und D(8) mit Pol B (aus Rattenleber). Im Standardtestzeitraum von 10 min lief die Reaktion auf beiden templates linear. Einer linearen Reaktionskinetik bis 15 min folgte die Transkription von Oligonukleosomen mit E. coli RNA Polymerase (Abb. 42).

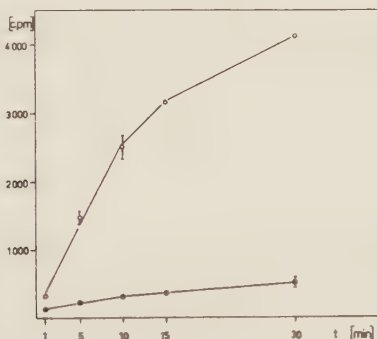


Abb. 41 Transkriptionskinetik von Pol B auf n(8) und D(8)

n(8) und D(8) wurden bei einer Konzentration von 28 $\mu\text{g/ml}$ mit 1 u/ml Pol B (Rattenleber) im Testsystem 2 transkribiert (Salzkonzentration 80 mM AS). Zu den angegebenen Zeiten wurden aus einem 250 μl Ansatz zweimal je 25 μl zur Bestimmung der säurefällbaren Radioaktivität entnommen. Die gezeichneten Punkte sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

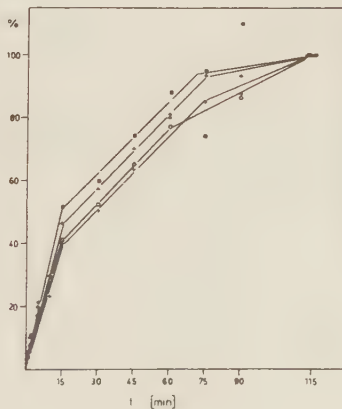


Abb. 42 Transkriptionskinetik von E. coli Polymerase auf Oligonukleosomen

Oligonukleosomen wurden bei den angegebenen Konzentrationen ($n(8), 25$; $n(6), 20$; $n(4), 16$; $n(2), 13$ $\mu\text{g/ml}$) im Testsystem 1 mit $9,5$ $\mu\text{g/ml}$ E. coli Pol transkribiert. Aus einem 12 - fachen Testansatz wurden zu den angegebenen Zeitwerten je 50 μl entnommen und die säurefällbare Radioaktivität bestimmt.
 a) direkte Auftragung der Inkorporation gegen die Inkubationszeit
 b) die Kurven der einzelnen $n(i)$ wurden auf ihren jeweiligen letzten Meßwert (115 min) normiert. Auftragung in % dieses Endwertes.

+ ——— + $n(2)$
 ○ ——— ○ $n(4)$
 ■ ——— ■ $n(6)$
 △ ——— △ $n(8)$

Abb. 42a und deutlicher Abb. 42b (nach Normierung des Einbaus auf den 115 min Zeitwert) zeigen, daß die Transkriptionskinetiken von Oligonukleosomen, nahezu unabhängig von der Kettenlänge i , einem dreiphasigen Muster folgten. E. coli Polymerase, die 90 min unter Testbedingungen, aber in Abwesenheit von template, inkubiert wurde, verlor in diesem Zeitraum 12% ihrer Ausgangsaktivität. Die mit i zunehmende Inkorporation war in dem in Abb. 42 gezeigten Experiment teilweise durch die unterschiedlichen Nukleosomenkonzentrationen im Test bedingt.

Die gezeigten, während der ersten 10 min linearen Transkriptionskinetiken schließen aus, daß Effekte der template Länge i , wie sie im folgenden gezeigt werden, durch einen frühzeitigen Abbruch der Transkription verursacht wurden.

2.4 Längenbestimmung der RNA Transkripte

Nukleosomen und nukleosomale DNA unterschiedlicher Kettenlänge i wurden mit E. coli Polymerase 15 min bei 37°C transkribiert. Die Transkripte wurden deproteinisiert und durch Gelpermeationschromatographie von Salz und niedermolekularer Radioaktivität befreit (Abb. 43). Der nach Lyophilisation verbleibende Rückstand wurde in Formamid gelöst und in einem Formamidgel elektrophoretisiert (Maniatis et al., 1975).

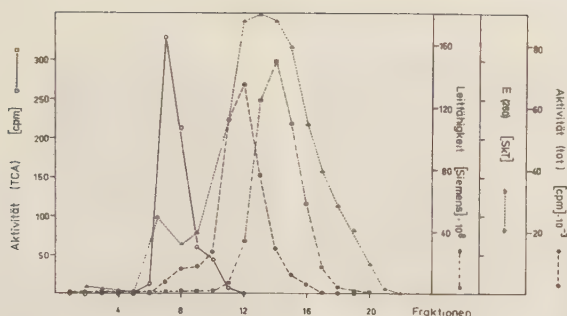


Abb. 43 Isolierung von Transkripten auf Sephadex G 25

D(i) und n(i) wurden transkribiert wie in der Legende zu Abb. 44 angegeben. Die Reaktion wurde gestoppt durch die Extraktion der Nukleinsäuren (s. II,2.1.9). Säurefällbare Transkripte wurden von niedermolekularem Material durch Chromatographie auf Sephadex G 25 abgetrennt (s. II,2.1.10). Zur Bestimmung der Gesamtradioaktivität in den Fraktionen wurden je 10 μ l auf Nitrocellulosefilter gespottet, die mit 5 prozentiger TCA befeuchtet worden waren. Säurefällbare Radioaktivität wurde in 10 μ l Aliquots nach dem Standardverfahren bestimmt. Die Leitfähigkeit wurde nach 1 : 20 Verdünnung von 10 μ l Aliquots gemessen.

Die Fluorogramme in Abb. 44a) und b) lassen erkennen, daß die RNA Transkripte ein ähnliches Bandenmuster wie die eingesetzten templates aufwiesen, unabhängig davon ob von n(i) oder D(i) ausgegangen wurde. Das Muster wurde auch beobachtet, wenn vor der Extraktion der Nukleinsäuren die DNA mit RNase - freier DNase (s. II,2.1.11) abgebaut worden war. Die wegen der stark denaturierenden Elektrophoresebedingungen unwahrscheinliche Möglichkeit, daß die Transkripte als Hybrid mit ihrem template wanderten, kann dadurch ausgeschlossen werden.

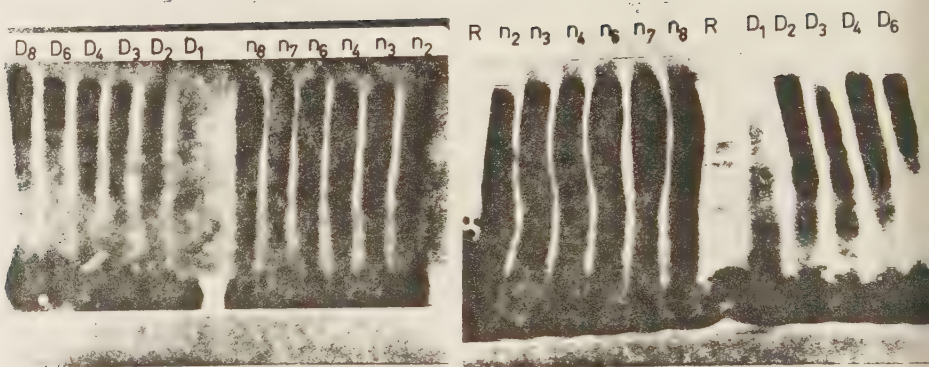


Abb. 44 Transkriptanalyse auf Formamidgelen

n(i) und D(i) wurden bei folgenden template Konzentrationen transkribiert n(2) : 17,5 ; n(3) : 17,0 ; n(4) : 20,5 ; n(6) : 20,0 ; n(7) : 17 ; n(8) : 24 ; D(1) : 22 ; D(2) : 40 ; D(3) : 44,5 ; D(4) : 46 ; D(6) : 41,5 ; D(8) : 47 $\mu\text{g/ml}$. D(i) wurden im 2,5 - fachen, n(i) im 10 - fachen Volumen von Testsystem 1 transkribiert (250 bzw. 1000 μl). Transkribiert wurde mit 12,5 u/ml E. coli RNA Polymerase 15 min bei 37 C. Die Transkripte wurden isoliert wie in Abb. 43 beschrieben. Die Fraktionen mit säurefällbarer Radioaktivität wurden lyophilisiert, in 30 μl Formamid aufgelöst und wie beschrieben weiterbehandelt (s. II,2.3.5). Je 8 μl der denaturierten Proben wurden auf ein 5 % PAA Gel in 99 % Formamid aufgetragen und unter Wasserkühlung elektrophoretisiert (s. II,2.3.5, Vorschrift a). Fluorographie (s. II,2.5) . R bezeichnet pBR322/Hae III Restriktionsfragmente (s. II,2.1.8).

a) 0,06 mM UTP, 0,33 Ci/mMol (16 h exponiert)

b) 0,6 mM UTP, 3,3 Ci/mMol (90 h exponiert)

Durch Vergleich mit Tritium - markierten Restriktionsfragmenten (pBR322, Hae III, Sutcliffe, 1978,) wurde gefunden, daß sich das Muster aus ganzzahligen Vielfachen von 147 b zusammensetzte. Dieser Wert ist nur eine Näherung, da RNA und DNA auf Formamidgelen kein identisches Laufverhalten aufweisen (Maniatis et al., 1975).

Bei Eichung über die Bromphenolblau- und Xylencyanol FF Laufstrecken (30 bzw. 255 b nach Maniatis et al., 1975) ergab sich für Transkripte von n(1) und D(1) ein Wert von 188 bp. (repeat Länge von Rattenleberchromatin 196 bp, Noll u. Kornberg, 1977; vgl. IIIA, 2.4). Zudem ist die DNA Länge von Mononukleosomen im Regelfall kürzer als die durch Differenzbildung, bei minimalem Verdau (Rückextrapolation auf die Verdauzeit 0) bestimmte repeat Länge. Es kann daher

mit einiger Zuverlässigkeit angenommen werden, daß eine längenmäßig vollständige Transkription der eingesetzten templates mit E. coli Pol stattfindet.

In den Fluorogrammen der Abb. 44 fällt auf, daß die Gelspuren von Transkripten kurzer Oligonukleosomenketten auch in Bereichen geschwärzt sind, wo sich nur Transkripte längerer Nukleosomenketten befinden sollten. Wie in 2.6 gezeigt wird, ergaben längere Nukleosomenketten mit E. coli Pol einen höheren Einbau. Es ist daher denkbar, daß Kontaminationen einer Nukleosomenpräparation $n(i)$ mit länger-kettigen $n(j)$ ($j > i$) für die Schwärzung im höhermolekularen Bereich verantwortlich sind.

Der Vergleich von Abb. 44a) und b) zeigt, daß eine 10 - fache Verringerung der UTP Konzentration gegenüber der Äquimolarität mit den anderen Triphosphaten, zumindest bei der groben Analytik der RNA Längenbestimmung, ohne Einfluß auf das Transkriptionsverhalten ist (vgl. Dynan et al., 1977).

Die Ergebnisse aus der RNA Elektrophorese werden in 2.6 mit weiteren Resultaten zusammenfassend diskutiert.

2.5 Zahl der Bindungs- und Initiationsstellen auf Oligonukleosomen

Die Transkriptmuster in Abb. 44 ließen wegen der augenscheinlich nur an den Moleküleenden beginnenden Transkription erwarten, daß bei gleicher DNA Konzentration, längere templates weniger Initiationsstellen aufweisen sollten als kürzere. Umgekehrt sollten bei gleichen molaren Konzentrationen, Nukleosomen aller Kettenlängen eine gleiche Anzahl von Initiationsstellen aufweisen.

Methoden zur Bestimmung der Zahl der Bindungs- und Initiationsstellen sind vornehmlich von Cedar und Felsenfeld (1973) in die Chromatinforschung eingeführt worden. Während ihre Anwendung bei der Untersuchung des Transkriptionsverhaltens nackter DNA relativ unproblematisch ist, erfordert ihre Anwendung auf Chromatin und insbesondere auf Oligonukleosomen zusätzliche Kontrollen.

Die Prinzipien seien hier kurz vorgestellt und diskutiert.

2.5.1 Diskussion der Methoden

1. Bestimmung der Zahl der Bindungsstellen auf Chromatin und DNA durch Titration einer vorgegebenen Menge RNA Polymerase mit template und anschließender Elongation der initiierten Komplexe bei hoher Ionenstärke.

RNA Polymerase wird mit unterschiedlichen Konzentrationen an template in Gegenwart von drei Nukleosidtriphosphaten (NTP) eine hinreichende Zeit vorinkubiert, wobei sich ternäre Komplexe (wegen der Kontamination von NTP Präparationen mit anderen Triphosphaten häufig schon mit kürzeren RNA Ketten) ausbilden. Elongation dieser Komplexe wird gestartet durch Zugabe des vierten (markierten) Triphosphates (UTP oder

CTP). Gleichzeitig wird die Salzkonzentration auf 0,4 M AS erhöht. Dies soll sowohl eine Reinitiation der Polymerase verhindern (Anthony et al., 1966; Richardson, 1966; Fuchs et al., 1967; Matsukage, 1972), als auch die Vergleichbarkeit der Transkription auf Chromatin und nackter DNA ermöglichen. Wenn alles Enzym an template gebunden ist, bewirkt eine weitere Zugabe von template keine weitere Steigerung der Inkorporation. Aus der DNA Konzentration im Äquivalenzpunkt und der eingesetzten Enzymaktivität läßt sich die Zahl der Bindungsstellen berechnen.

Histone werden bei 0,4 M AS nur teilweise von der DNA entfernt. H3 und H4 bleiben selbst bei 1 M AS noch mit Chromatin assoziiert (Spelsberg u. Hnilica, 1971). Hentschel u. Tata (1977) beobachteten in stark heterochromatischen Zellkernen auch bei 0,4 M AS noch eine Stimulierung der Transkription durch Heparin. Selbst bei dieser Ionenstärke sind somit Unterschiede im Elongationsverhalten auf DNA und Chromatin nicht auszuschließen. Die Folgerung von Cedar und Felsenfeld (1973), daß E. coli RNA Polymerase auf Chromatin und DNA gleiche Elongationsraten aufweise, sollte daher nicht ohne Kontrollen auf andere Systeme übernommen werden.

Oligonukleosomen verschiedener Kettenlänge lassen keine gleich langen Transkripte erwarten. Wenn man annimmt, daß die Elongationsgeschwindigkeit von i unabhängig ist, dann sollte die Einbaurate im linearen Bereich der Kinetik ein Maß für die relative Zahl von Initiationsstellen sein.

2. Bestimmung der Zahl der Initiationsstellen auf DNA und Chromatin durch Vorinkubation des templates mit einem Überschuß an RNA Polymerase, Elongation bei hoher Ionenstärke und Bestimmung der RNA Länge.

Das Verfahren ist in der Durchführung ähnlich wie 1), gibt aber, da es über die RNA Längen auch die Zahl der RNA Ketten bestimmt, die Anzahl der Initiationsstellen. Die Zahl der RNA Ketten wird bestimmt durch Division der Gesamtinkorporation durch das Zahlenmittel der Kettenlänge. Die Elongation bei hoher Ionenstärke soll nur die Reinitiation verhindern.

3. Wie 2), aber Elongation in Gegenwart von Rifampicin oder anderen Initiationsinhibitoren, z.B. Rifamycin AF/013 für eukaryontische RNA Polymerasen.

4. Wie 2) oder 3), aber Bestimmung der Kettenlänge über terminale Nukleotide. Die Zahl der 5' Enden kann bei Markierung mit γ oder β [(32)P] Purinnukleosidtriphosphaten direkt über den Einbau erfaßt werden. Bei Markierung mit α [(32)P] muß eine chemische oder enzymatische Hydrolyse zu pppPup und Pup vorangehen. Damit läßt sich gleichzeitig die Zahl der Ketten und die mittlere Kettenlänge bestimmen.

Das 3' Ende ist auch bei Verwendung von Tritium - markierten Triphosphaten bestimmbar. Alkalische Hydrolyse führt zu Nukleosid und 2',3' Nukleosidmonophosphat. Auch hier wird die Zahl der Ketten und deren Durchschnittslänge bestimmt. Das Arbeiten mit γ [(32)P] Purinnukleosidtriphosphaten wird erschwert durch Kinaseaktivitäten sowohl in Chromatin (

Cedar u. Felsenfeld, 1973; Cedar, 1975), als auch noch in gereinigten Mononukleosomen (Simpson, 1978). Darüberhinaus hängt es stark von den Reaktionsbedingungen und der Art des templates ab, ob ATP oder GTP zur Initiation verwendet wird (Gissinger, 1974).

Die Bestimmung der Kettenlänge über 3' terminale Nukleotide erfordert die Kenntnis der Basenzusammensetzung des Transkripts (Cox, 1976). Diese wird aber nicht allein von der des templates bestimmt, sondern hängt ab von den Transkriptionsbedingungen (Pays, 1977), der Natur des templates (Chromatin vs. DNA, Marushige u. Bonner, 1966; Chan, 1976) sowie auch von der verwendeten RNA Polymerase (Beebe, 1979). Außerdem verschiebt sich in einer Serie von Oligonukleosomen die Basenzusammensetzung des templates (Nelson et al., 1979). Der analytische Aufwand ist daher wesentlich größer als bei den Methoden 1) - 3).

2.5.2 Bestimmung der relativen Zahl von Initiationsstellen für E. coli RNA Polymerase auf Oligonukleosomen. Elongation bei hoher Ionenstärke.

Abb. 45 zeigt die Reaktionskinetik von E. coli Polymerase auf n(3) und n(7) unter den Bedingungen, die in Punkt 1 der Methodendiskussion beschrieben worden sind. Die oberen beiden Kurven entsprechen einem niedrigen Enzym/DNA Verhältnis (Massenverhältnis von Enzym zu DNA = 0,84), die beiden unteren einem Enzymüberschuß (P/T = 16).

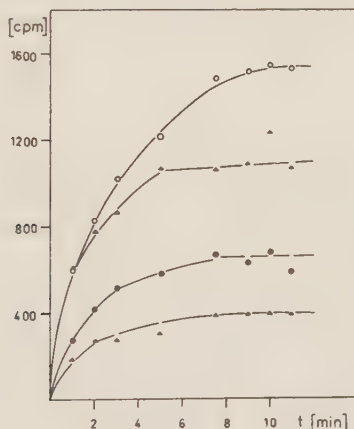


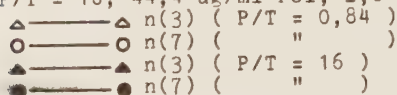
Abb. 45 E. coli RNA Polymerase auf Oligonukleosomen. Elongationskinetik bei hoher Ionenstärke nach Präinitiation

E. coli Pol wurde im Testsystem 3 mit n(3) bzw. n(7) und drei Triphosphaten 15 min bei 37 °C vorinkubiert. Die

Reaktion wurde gestartet durch Zugabe von $[^{3}H]$ UTP und AS. Zu den angegebenen Zeiten wurden je 125 μ l entnommen. Folgende Enzym- und template Konzentrationen herrschten während der Vorinkubation (gleiche Bedingungen für n(3) und n(7)).

P/T = 0,84; 22,2 μ g/ml Pol, 26,4 μ g/ml template

P/T = 16; 44,4 μ g/ml Pol, 2,8 μ g/ml template



 $\triangle$ ————— $\triangle$ n(3) (P/T = 0,84)

 $\circ$ ————— $\circ$ n(7) (P/T = 16)

Nimmt man für die E. coli RNA Polymerase eine Molmasse von 485 kD an, für 200 bp DNA eine von 132 kD, so beträgt das Massenverhältnis für eine molare 1:1 Stöchiometrie 3,67. Ein Massenverhältnis von 16 entspricht somit einem mehr als 4 - fachen molaren Enzymüberschuß, bezogen auf die mononukleosomale Grundeinheit der Oligonukleosomen. Der molare Überschuß bezogen auf die Oligonukleosomen selbst ist noch höher : 13 - fach für n(3), 30 - fach für n(7).

Bei dem P/T Verhältnis von 0,84 wurde der Plateauwert auf n(3) nach 5, auf n(7) nach 9 min erreicht. Die schnellere Fertigstellung der Transkripte auf n(3) steht in Einklang mit der Folgerung aus der Längenanalyse der Transkripte : längenmäßig vollständige Transkription der Nukleosomen. Aus den vier letzten Werten der Kinetik errechnen sich für die beiden unteren Kurven (Enzymüberschuß) Plateauwerte von 342/2 und 610/24 cpm für n(3) bzw. n(7) (Mittelwert/SD nach Abzug des backgrounds von 49 cpm), somit ein Plateauverhältnis von 1,78.

Innerhalb eines Experimentes stehen die Zeitwerte bis zum Erreichen eines Plateaus für zwei Nukleosomenlängen im gleichen Verhältnis zueinander, wie die Plateauhöhen der Kinetik unter Enzymsättigung.

Daß eine regelmäßige Beziehung zwischen der Plateauhöhe und den Kettenlängen der Nukleosomen bestand, zeigt Tabelle 20. In einem Experiment wurden alle Glieder einer Serie von n(i) ($1 \leq i \leq 8$) bei gleicher DNA Konzentration und einem P/T Verhältnis von 12 10 min transkribiert. Die Plateaux wurden in diesem Zeitraum erreicht. Die Plateauwerte waren jeweils etwa das i - fache eines kleinsten gemeinsamen Wertes. Die starke Abweichung für i = 8 kann daran liegen, daß die letzte Nukleosomenfraktion einen hohen Anteil an längeren Ketten enthalten kann (s. IIIA,2.2).

Tabelle 20 Abhängigkeit der Plateauinkorporation auf Nukleosomen von der Kettenlänge. Elongation bei hoher Ionenstärke.

i	1	2	3	4	5	6	7	8
p	668/22	1451/151	2628/159	3561/416	4646/259	4487/430	6058/312	7455/365
p/i	668/22	740/75	876/59	890/104	929/52	745/72	865/44	922/46
p/ $\bar{r}$	0,80	1,79	3,16	4,28	5,59	5,40	7,29	8,93
r/ $\bar{r}$	0,80	0,89	1,05	1,07	1,12	0,9	1,04	1,12

Nukleosomen wurden bei 5,5 ug/ml mit E. coli Pol (66,7 ug/ml, P/T = 12) unter den Bedingungen von Testsystem 3 vorinkubiert und gestartet. Die Plateauinkorporationen p sind in cpm angegeben (Mittelwert/SD aus drei Bestimmungen). Division von p durch i ergibt r. In der vierten Zeile sind die Plateauinkorporationen durch den Mittelwert von r ($\bar{r}$ = 831/99) dividiert. In der letzten Zeile sind diese Werte nochmals auf i bezogen.

Die Plateauhöhe bei einer Kinetik unter den Reaktionsbedingungen dieses Abschnitts ist gegeben durch das Produkt aus dem Zahlenmittel der Transkriptlänge und der Anzahl der synthetisierten Ketten. Die Inkorporation ist daher auf templates, die unterschiedliche Transkriptlängen ergeben, kein direktes Maß für die relative Anzahl an Initiationsstellen. Sind die Transkriptlängen dagegen bekannt, lassen sich Angaben über diese Relation machen.

Im Abschnitt 2.6 werden die hier wiedergegebenen Ergebnisse zusammen mit anderen Experimenten diskutiert. Die z.B. in Tabelle 20 dargestellte klare Abhängigkeit der Plateauinkorporation von i erlaubt die Folgerung der längenmäßig vollständigen Transkription der Nukleosomen. Aus der Plateauhöhe läßt sich die Zahl der transkribierten Nukleosomen bestimmen : sie liegt bei Mononukleosomen bei weniger als 5 % der eingesetzten template Moleküle.

2.5.3 Bestimmung der relativen Zahl von Initiationstellen für E. coli RNA Polymerase auf Oligonukleosomen. Elongation in Gegenwart von Rifampicin.

Ebenso wie die Durchführung der Reaktion bei hoher Ionenstärke verhindert auch Rifampicin die Reinitiation der bakteriellen RNA Polymerase (Sippel u. Hartmann, 1968, 1970; für eine Übersicht über neuere Ergebnisse s. Niermann u. Chamberlin, 1979).

Wie Abb. 46 zeigt, stellte sich aber, anders als bei hoher Ionenstärke auch nach 60 minütiger Reaktion noch kein Plateau ein.

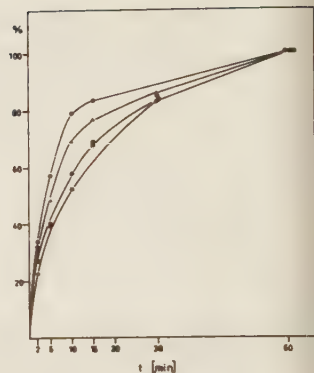
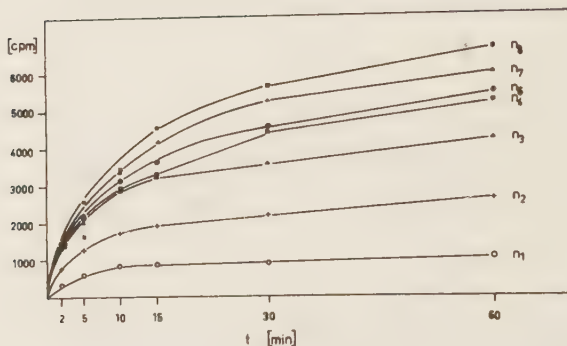


Abb. 46 *E. coli* RNA Polymerase auf Oligonukleosomen.
Elongationskinetik in Gegenwart von Rifampicin
nach Präinitiation.

E. coli Pol wurde unter den Bedingungen, die in der Legende zu Tabelle 21 angegeben sind mit Nukleosomen vorinkubiert und gestartet. Zu den angegebenen Zeitwerten wurden je 50 μ l entnommen.

a) direkte Auftragung der Inkorporation [cpm] gegen die Synthesedauer [min]

b) Auftragung der Kinetik in Prozent der jeweiligen 60 min Werte für $n(1)$, $n(3)$, $n(6)$ und $n(8)$.

Analog zu den Ergebnissen in Tabelle 20 stieg aber auch in Gegenwart von Rifampicin der Einbau mit zunehmender Kettenlänge (Tabelle 21). Abb. 46b) macht deutlich, daß die Reaktionsgeschwindigkeit von kürzeren Oligonukleosomen gegen Ende der Kinetik stärker abflachte als die von längeren. Bei noch längeren Reaktionszeiten würden daher die Endwerte länger $n(i)$ in stärkerem Maß zunehmen als die von kurzen. Das würde für die auf i normierten Plateauwerte von $n(6,7,8)$ eine Annäherung an den entsprechenden Wert der kürzeren Nukleosomenketten bedeuten.

Tabelle 21 zeigt den Zusammenhang zwischen dem 60 min Wert der Kinetik (wird hier ebenfalls als "Plateauwert" bezeichnet) und dem nukleosomalen Längenindex i .

Tabelle 21 Abhängigkeit der Plateauinkorporation auf Nukleosomen von der Kettenlänge. Elongation in Gegenwart von Rifampicin.

i	1	2	3	4	6	7	8
p	1049	2622	4194	5229	5421	5968	6600
p/i	1049	1311	1398	1307	903	852	832
p/r'	0,96	2,40	3,84	4,78	4,96	5,46	6,04
r/r'	0,96	1,20	1,28	1,19	0,82	0,78	0,75

Nukleosomen wurden 11,1 $\mu\text{g/ml}$ mit E. coli Pol (56,7 $\mu\text{g/ml}$, P/T = 5,1) unter den Bedingungen von Testsystem 4 vorinkubiert und gestartet. Als Plateauwerte p wurden die Inkorporationen [cpm] nach 60 min gewählt. Division von p durch i ergibt r. Der Mittelwert/SD von r betrug $r' = 1093/242$ cpm.

Das in Abb. 46 dargestellte langsame Erreichen der Plateauwerte kontrastiert mit dem Befund aus der Längenanalyse der RNA Transkripte (s. Abb. 44), wo bereits nach 15 min Transkripte der ganzen template Länge gefunden worden waren. Die Möglichkeit, daß durch die Gegenwart von Rifampicin der Elongationsprozeß so stark verlangsamt war, daß die Transkription von 1000 bp bei 37 °C länger als 1 h dauerte, erscheint unwahrscheinlich.

Eine zweite Möglichkeit ist, daß die Elongation so schnell war, daß eine RNA Analyse auch bei kurzen Transkriptionszeiten (15 min) bereits Transkripte der vollen Länge ergab. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt wäre dann der Start präinitiiertter Komplexe. Schäfer et al. (1973) beschrieben Typen von Heparin-resistenten Initiationskomplexen des E. coli Holoenzym auf T4 DNA : schnelle und verzögerte Startkomplexe ("rapid a. delayed starters"). Bei geringen Ionenstärken sei der Übergang zwischen diesen beiden Komplexen geschwindigkeitsbestimmend für die Transkription. Durch Vorinkubation konnte die Zeit zur Erreichung eines Transkriptionsplateaus im System der Autoren stark reduziert werden. Bei Sättigung des templates konnten von einem promoter, auch bei Ausschluß von Reinitiation, mehrere Ketten transkribiert werden. Die Befunde wurden von Schäfer et al. (1973) so interpretiert, daß sich verzögerte Startkomplexe in einer Präinitiationsregion ("storage stretch") vor dem promoter befinden können sollten. Geschwindigkeitsbestimmend sei der Übergang aus dieser Region in die Startposition. Die Daten der Autoren würden, was die Salzbedingungen während der Präinkubation im hier gewählten System (166,7 mM KCl, 5,5 mM Magnesiumchlorid, 1,1 mM Manganchlorid), sowie die Präinkubationszeit (15 min bei 37 °C) angeht, ein wesentlich schnelleres Erreichen der Plateauwerte erwarten lassen. Die Autoren fanden aber auf verschiedenen Bakteriophagen DNA's unterschiedliche Initiationsverhalten, so daß möglicherweise die Art des templates (nukleosomal, Eukaryonten DNA) für die Unterschiede verantwortlich ist. Neuere Untersuchungen finden eine Heterogenität im Startverhalten auch bei präinitiierten, isolierten ternären Komplexen an definierten Promotoren (W. Schulz, persönliche Mitteilung). Unterschiede

im Initiationsverhalten auf DNA und Chromatin sind von DiMauro et al. (1977) beobachtet worden. DiMauro et al. (1978) fanden einen stabilisierenden Einfluß von NHCP auf schnell startende Initiationskomplexe. NHCP fehlten auf Nukleosomen, die nach der beschriebenen Methode (s. II, 2.1.3) hergestellt wurden weitgehend (Kittlaus, 1980). Da Nukleosomen die DNA stabilisieren (Woodcock u. Frado, 1975; Mandel u. Fasman, 1976; Lewis, 1977) ist es denkbar, daß NHCP für eine effektive Initiation auf Chromatin-DNA notwendig sind.

Wie Abb. 46b) zeigt, wurden in den ersten 10 min der Kinetik 50 - 80 % der nach 60 min synthetisierten RNA Menge transkribiert. Dies wäre mit der Existenz von schnell und langsam startenden Rifampicin-resistenten Komplexen gut zu vereinbaren.

Im Gegensatz dazu war bei hoher Ionenstärke die Transkription auf allen templates nach 10 min abgeschlossen (Abb. 45). Da die Vorinkubationsbedingungen der in den Abbildungen 45 und 46 dargestellten Experimente gleich waren, müßten die hypothetischen, Rifampicin-resistenten langsamen Startkomplexe bei hoher Ionenstärke entweder zerfallen oder schnell starten. Diese Hypothese wird in 2.9 nochmals aufgegriffen.

2.5.4 Bestimmung der Zahl von Bindungsstellen für E. coli RNA Polymerase auf Oligonukleosomen. Elongation bei hoher Ionenstärke.

Wie in Punkt 1 der Methodendiskussion beschrieben wurde, erlaubt die Titration einer vorgegebenen Menge template mit Enzym, oder umgekehrt, unter Bedingungen, die eine Reinitiation verhindern, die Bestimmung der Anzahl an Bindungsstellen.

Eine molare 1:1 Stöchiometrie von E. coli Polymerase zur mononukleosomalen Grundeinheit der Oligonukleosomen entspricht einem Massenverhältnis von 3,67 (s. 2.5.2). Wenn die Polymerase nur an die (beiden) Enden der Nukleosomen bände, würde man den Äquivalenzpunkt der Titration bei 3,67 (7,34) für $n(1)$, 1,83 (3,67) für $n(2)$, 0,92 (1,83) für $n(3)$ usw. erwarten.

Abb. 47a) zeigt, daß in einem Bereich $< 3,4$ keine Äquivalenzpunkte auftraten (der leichte Knick bei Mononukleosomen könnte von einer Titration nackter DNA herrühren, die in Mononukleosomenpräparationen bei geringer Konzentration auftreten soll, Lilley et al., 1979). Im untersuchten Bereich des P/T Verhältnisses waren die Bindungsstellen von Nukleosomen somit noch nicht gesättigt.

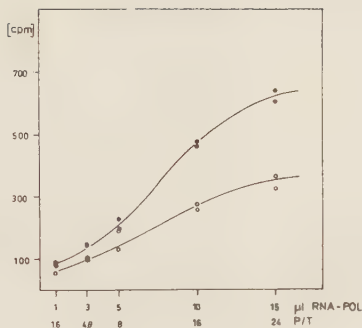
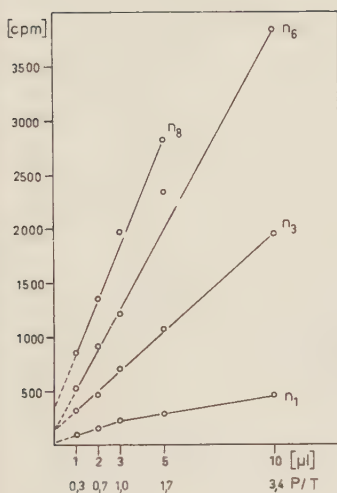


Abb. 47 E. coli RNA Polymerase auf Oligonukleosomen.
Titration des templates. Elongation bei hoher
Ionenstärke.

a) $n(i)$ wurden bei einer Konzentration von 11,1 $\mu\text{g/ml}$ in den angegebenen P/T Verhältnissen mit E. coli Pol in Testsystem 3 vorinkubiert und gestartet. Die erste Abszissenzeile gibt das im Test eingesetzte Volumen der RNA Pol Lösung (340 $\mu\text{g/ml}$).

b) Oligonukleosomen wurden bei einer Konzentration von 2,8 $\mu\text{g/ml}$ in den angegebenen P/T Verhältnissen mit E. coli Pol wie in a) angegeben inkubiert. Die erste Abszissenzeile gibt das im Test eingesetzte Volumen der RNA Pol Lösung (400 $\mu\text{g/ml}$).

○ — ○ n_1 ● — ● n_2
In der zweiten Abszissenzeile sind die Massenverhältnisse von Enzym zu template (P/T - Werte) angegeben. Alle Punkte sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

Abb. 47b) zeigt ein Experiment, in dem daher noch höhere Werte des P/T Verhältnisses untersucht worden waren. Die genaue Bestimmung eines Knickpunktes war wegen des sigmoiden Charakters der Kurven nicht möglich. Auf beiden templates setzte die Plateauphase bei einem P/T Verhältnis von etwa 16 ein.

Die Daten in den Abbildungen 47a) und b) waren durch Titration einer konstanten Menge template mit steigenden Mengen Polymerase erhalten worden. Die umgekehrte Titration

sollte das gleiche Ergebnis bringen. Eine solche ist in Abb. 48 wiedergegeben. 6 μg Enzym wurden mit steigenden Mengen n(3) inkubiert. Der Äquivalenzpunkt lag wiederum bei einem P/T Verhältnis von 16.

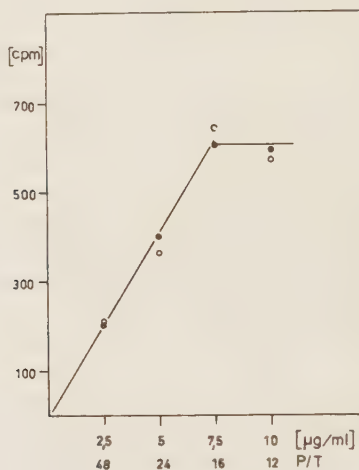


Abb. 48 E. coli RNA Polymerase auf Oligonukleosomen.
Titration des Enzyms. Elongation bei hoher Ionenstärke.

E. coli Pol wurde bei einer Konzentration von 66, 7 $\mu\text{g/ml}$ in den angegebenen Massenverhältnissen mit n(3) in Testsystem 3 vorinkubiert und gestartet. Die erste Abszissenzeile gibt die Konzentrationen der eingesetzten Nukleosomenlösungen ($\mu\text{g/ml}$ in 1 mM Tris, 40 mM NaCl, 0,2 mM EDTA, pH 7,9). Die zweite Abszissenzeile gibt die eingesetzten Massenverhältnisse von Enzym zu template. Leere und volle Kreise sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten.

Die beiden komplementären Titrationsexperimente lieferten somit das gleiche Ergebnis.

Ein P/T Verhältnis von 16 bedeutet einen beinahe 5 - fachen molekularen Überschuß des Enzyms gegenüber der Konzentration an mononukleosomalen Grundeinheiten. Die beiden folgenden Punkte behandeln zwei mögliche Ursachen für das gefundene Sättigungsverhalten.

1. Eine höhere zur Sättigung des templates notwendige Enzymkonzentration als die aus einer 1:1 Stöchiometrie

zwischen Enzym und den wahrscheinlichen Initiationsstellen (Molekülenden) berechnete, kann bedeuten, daß nur ein Teil der Polymerase in der Lage ist, an das template zu binden. Chamberlin et al. (1979) sowie Shimatoto und Wu (1980) fanden mit Tests, die die Bestimmung der Zahl an aktiven Molekülen in Präparationen von *E. coli* RNA Polymerase erlauben, daß ihr Anteil zwischen 10 und 90 % schwanken kann, wobei allerdings die Inaktivität der Enzyme nicht auf der Unfähigkeit zu binden beruhen muß. Je größer der Anteil an Enzym ist, der nicht an das template binden kann, um so höhere Enzymkonzentrationen werden zur Sättigung des templates benötigt.

2. Nukleosomen enthalten neben den Initiationsstellen zusätzliche Bindungsbereiche. Cedar und Felsenfeld (1973), die Bindungs- und Initiationsstellen für *E. coli* Polymerase auf Chromatin bestimmten, fanden, daß deren Zahl gleich war. Cedar (1975) dagegen bestimmte für Pol B auf Chromatin eine 10 - fach höhere Zahl von Bindungs- als Initiationsstellen.

Die zur Sättigung notwendige Enzymkonzentration war von der Länge der Nukleosomen (bei konstanter DNA Konzentration) unbeeinflusst (s.a. Abb. 50). Unter Annahme einer hohen Assoziationskonstante und der vollen Bindungsfähigkeit aller zugegebenen Polymerasemoleküle für das template bedeutet dies die Bindung von 5 - 7 Enzymen pro mononukleosomale Grundeinheit. Eine genauere Bestimmung war wegen des sigmoiden Charakters der Kurven nicht möglich. Nimmt man einen Mittelwert von 6, ferner Kugelform mit einem Durchmesser von etwa 100 Å sowohl für das Nukleosom wie für die Polymerase an, (Finch et al., 1977; Fuchs et al., 1964), so ergäben sich als einfachste Strukturen Koordinationsgeometrien vom Typ dichtester Kugelpackungen, entsprechend etwa dem Schichtgitter von Cadmiumjodid. Daß Nukleosomen ein hohes Bindungsvermögen für weitere Moleküle haben (für das Histonoktamer bis zur maximal möglichen Koordination von 12) ist bereits gezeigt worden (Stein, 1979; Voordouw u. Eisenberg, 1978).

2.5.5 Vorversuche zur Bestimmung der Initiationsstellen für *E. coli* RNA Polymerase auf Oligonukleosomen über die Zahl der 3' terminalen RNA Enden

Das Verfahren mit seinen Komplikationsmöglichkeiten ist in der Methodendiskussion vorgestellt worden. Die Versuche wurden unternommen, da die Methode einerseits die Möglichkeit bietet, Elongationsraten zu bestimmen, ohne die Struktur des Nukleosoms zu beeinflussen, was bei der Verwendung von hohen Salzkonzentrationen, Rifampicin oder Rifamycin AF/013 unvermeidlich ist (Lilley et al., 1979), andererseits aber auch erlaubt, die Zahl der Initiationen, sowie die durchschnittlichen Kettenlängen zu bestimmen.

Bei einer Transkriptlänge von 1800 b (n(8)) macht die Inkorporation in das terminale Nukleotid der Kette etwa 0,06 % der Gesamtinkorporation aus. Um eine genügend hohe Radioaktivität im terminalen Nukleotid zu erhalten, wurde

daher mit höheren spezifischen Aktivitäten von $[(3)H]$ UTP als im Standardtest gearbeitet. Nukleosomen wurden transkribiert, die Transkripte isoliert und hydrolysiert, und die Hydrolysate auf PEI Cellulose aufgetrennt. Abb. 49 zeigt das Fluorogramm einer Auftrennung von U und UMP auf PEI Cellulose.



Abb. 49 Längenanalyse von RNA Transkripten durch UMP/U Bestimmung. Fluorogramm einer UMP/U Trennung auf PEI Cellulose.

Oligonukleosomen ($n(3) - n(8)$) wurden im Testsystem 1 (500 μ l Volumen) unter veränderten UTP Bedingungen (5 μ M UTP, 50 Ci/mMol) 15 min bei 37 °C transkribiert. (Ausgangskonzentrationen der $n(i)$: 76,5 ; 75,2 ; 57,5 ; 63,2 ; 49,5 ; 45,5 μ g/ml für $n(3) - n(8)$). Die Reaktionen wurden gestoppt durch Phenolisieren in Gegenwart von 50 μ g tRNA carrier, dialysiert und lyophilisiert (der Lösung $n(8)$ wurde vor Lyophilisation noch zusätzlich 10 μ l 0,06 mM $[(3)H]$ UTP, 830 mCi/mMol vor Lyophilisation zugegeben, um die Stabilität von UTP unter Hydrolysebedingungen zu testen.). Nach der Hydrolyse unter Standardbedingungen (s. II,2.2.5) wurde zusätzlich 10 min bei 90 °C inkubiert. Je 10 μ l der neutralisierten Hydrolysate (120000 - 200000 cpm bei 21 % Zählausbeute) wurden auf PEI Cellulose chromatographiert. Fluorographie der Chromatogramme erfolgte (216 h) bei - 70 °C. Die drei rechten Spalten enthielten U bzw. UMP (unmarkiert, die Positionen der Flecke sind eingezeichnet), bzw. 10 μ l einer $[(3)H]$ UTP Lösung (s.o.).

Tabelle 22 gibt für verschiedene Oligonukleosomen die in den Positionen von U und UMP gemessene Radioaktivität und die daraus berechneten Kettenlängen. Die Verhältnisse entsprechen Kettenlängen zwischen 20 und 30 b.

Tabelle 22 Längenanalyse von RNA Transkripten durch Bestimmung des UMP/U Verhältnisses. Quantifizierung von UMP und U nach PEI Cellulose Chromatographie.

	n(3)	n(4)	n(5)	n(6)
U	731/43	694/95	522/3	674/17
UMP	22436/52	15393/803	13906/312	14053/315
UMP/U	30,7	22,2	26,6	20,8

Die Proben entstammten dem in Abb. 49 beschriebenen Experiment. Von den 4 Hydrolysaten wurden je 5 und 8 μ l auf eine PEI Cellulose Platte aufgetragen und wie beschrieben (s. II,2.2.6) chromatographiert. Gleich große Flächen von 2,25 cm² wurden ausgekratzt und die darin enthaltene Radioaktivität bestimmt. Die angegebenen Werte sind auf 5 μ l Auftragelösung bezogen (Mittelwert/SD).

Im folgenden werden Erklärungsmöglichkeiten für diese unerwartet niedrigen Werte diskutiert.

1. UMP wird während der Prozedur zu U hydrolysiert. Cox (1976) bestimmte für seine Methodik, wie sich ein vorgegebenes UMP/U Verhältnis während der Prozedur verkleinerte. Aus den in der zitierten Publikation angegebenen Daten läßt sich eine 1.1 prozentige Umwandlung von UMP zu U berechnen. Bei einem für Transkripte von Pentanukleosomen erwarteten UMP/U Verhältnis von 1000 würde das eine Reduktion des Verhältnisses um einen Faktor größer als 10 auf einen Wert von 82 bedeuten.

Wären die gefundenen kurzen Kettenlängen ein Konversionsartefakt von UMP zu U, so müßte unter den hier angewandten Bedingungen eine etwa 3,5 % Hydrolyse von UMP stattgefunden haben. In der Tat wurde in dem gezeigten Experiment mit etwas schärferen Hydrolysebedingungen als üblich gearbeitet, da nach der Hydrolyse unter Standardbedingungen (s. II,2.2.5) RNA noch nicht vollständig hydrolysiert war.

2. Bei der niedrigen UTP Konzentration im Test (5 μ M) kann die Elongation durch "pausing" verlangsamt worden sein, so daß im Synthesezeitraum (15 min) möglicherweise nur Ketten der gefundenen Länge (nach Korrektur etwa 80 b) gebildet worden sind (R. S. Beabealashvili , persönliche Mitteilung).

3. Die durch die UMP/U Methode bestimmten Längen sind Zahlenmittel. Die Anwesenheit kurzer Transkripte im Hydrolyseansatz würde diese Mittelwerte stark erniedrigen. Die Radioaktivität an der Elektrophoresefront in Abb. 44a) und b) hatte die Mobilität von Bromphenolblau, sollte nach Maniatis et al. (1975) damit eine RNA Länge von etwa 30 b haben. Nach Sepharose G 25 Chromatographie der Transkripte wurden die Fraktionen gepoolt, die säurefällbare Radioaktivität enthielten. Oligonukleotide sind mit TCA bis herab zu

einer Länge von 4 - 15 bp fällbar (Cleaver u. Boyer, 1972). Das gepoolte Material konnte daher auch kurze Ketten enthalten. Es ist möglich, daß unter den Transkripten ein großer Anteil an früh abgebrochenen Ketten ist.

Der Abschnitt zeigt, daß die Methode der Endgruppenanalyse Werte für Kettenlängen und Elongationsraten ergibt, die wegen der experimentellen Schwierigkeiten mit Vorbehalt zu betrachten sind.

2.6 Hypothese : Längenmäßig vollständige Transkription von Oligonukleosomen durch eine Subpopulation der E. coli RNA Polymerase Präparation.

Die Ergebnisse der vorhergehenden Abschnitte zeigten eine längenmäßig vollständige Transkription von Oligonukleosomen durch E. coli RNA Polymerase. Im vorliegenden Abschnitt werden verschiedene Modelle mit den Transkriptionsdaten verglichen. Aus dem Vergleich läßt sich folgern, daß nur ein Teil aller Polymerasemoleküle an der Transkription beteiligt ist.

In den Tabellen 20 und 21 war ein Zusammenhang zwischen der nukleosomalen Kettenlänge i und der Menge an säurefällbarer Radioaktivität im Plateau der Reaktionskinetik gefunden worden. Die Reaktionsbedingungen schloßen in beiden Fällen Reinitiation aus. Ferner sei betont, daß alle Kettenlängen bei der gleichen DNA Konzentration, damit aber bei unterschiedlichen molaren Konzentrationen der verschiedenen Oligonukleosomen transkribiert wurden. Das molare Konzentrationsverhältnis in der Serie $n(1):n(2):...n(8)$ war wie 8:4...:1. Das P/T Verhältnis hat in der Tabelle 20 den Wert 12, in Tabelle 21 den Wert 5,1. Die templates waren in beiden Fällen nicht vollständig gesättigt (zur Sättigung notwendiger P/T Wert : 16, s. Abb. 47b) und 48). Abb. 50 und die zugehörige Tabelle 23 zeigen, daß der Zusammenhang zwischen Inkorporation im Plateau der Kinetik und der Kettenlänge i unabhängig vom P/T Verhältnis war.

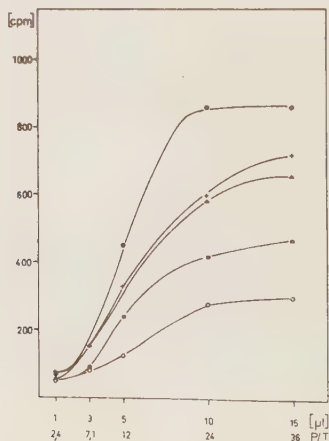


Abb. 50 E. coli RNA Polymerase auf Oligonukleosomen.
Titration des templates. Elongation bei hoher
Ionenstärke.

n(1) wurden bei einer einheitlichen Konzentration von 1,86 $\mu\text{g/ml}$ in den angegebenen P/T Verhältnissen mit E. coli Pol 15 min bei 37 °C im Testsystem 3 vorinkubiert und danach gestartet. Die erste Abszissenzeile gibt das im Test eingesetzte Volumen an RNA Pol Lösung (400 $\mu\text{g/ml}$).

○ — ○ n(2), □ — □ n(4), △ — △ n(5),
+ — + n(7), ● — ● n(8).

Tabelle 23 Abhängigkeit der Plateauinkorporation auf Oligonukleosomen von der Kettenlänge. Elongation bei hoher Ionenstärke. Vergleich verschiedener P/T Werte.

	i	2	4	5	7	8
P/T = 36	p	262	429	622	681	820
	p/i	131	107	124	97	102
	r/r'	1,17	0,95	1,11	0,87	0,91
P/T = 24	p	241	382	545	557	820
	p/i	120	95	109	80	102
	r/r'	1,18	0,94	1,08	0,79	1,01
P/T = 12	p	83	198	NT	291	416
	p/i	41	49		42	52
	r/r'	0,89	1,08		0,90	1,13

Die Werte sind Abb. 50 entnommen. Ein background von 40 cpm wurde abgezogen. Division der Plateauinkorporation p durch den Kettenlängenindex i ergibt das Verhältnis r. r' ist jeweils der Mittelwert aus den r - Werten einer Zeile.

Wie die Schemata in Abb. 51 zeigen würde man die gefundene Beziehung zwischen i und Plateauinkorporation nur bei einem Unterschuß an Enzym erwarten. Da die Proportionalität zwischen i und der Plateauinkorporation bis zu einem Wert von i = 8 untersucht und gefunden worden war, muß der Enzymunterschuß so groß sein, daß höchstens 12,5 % aller Mononukleosomen initiiert und transkribiert werden können (Schema b). Dabei sollte die Enzymkonzentration unterhalb dieses Werte beliebig klein gewählt werden können. Solange auf weniger als 12,5 % aller n(1) initiiert und transkribiert werden kann sollte die direkte Proportionalität zwischen i und der Plateauinkorporation bestehen bleiben.

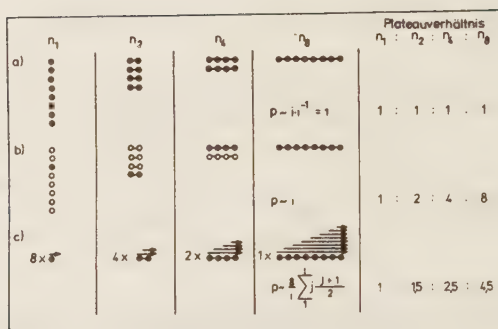


Abb. 51 Modelle zur Nukleosomentranskription mit E. coli RNA Polymerase bei ausgeschlossener Reinitiation

- a) Sättigung mit Enzym. Initiation nur an den Enden.
 b) Enzymüberschuß. Auf $< 12,5\%$ aller $n(1)$ wird initiiert. Initiation nur an den Enden.
 c) Sättigung mit Enzym. Initiation auch in linker Regionen.

Bei Enzymüberschuß sollten alle template Moleküle, unabhängig von ihrer Zahl transkribiert werden. Bei Transkription der vollen template Länge führte dies, wie aus Schema a) in Abb. 51 ersichtlich ist, zu einem 1:1:1... Verhältnis der Plateauinkorporationen. Es bestünde keine Abhängigkeit von der Kettenlänge. Die Annahme, daß bei Enzymüberschuß zwar alle Moleküle transkribiert werden, auf $n(1)$ aber nur Transkripte von $1/8$ Länge (25 b), auf $n(2)$ Transkripte von $1/4$ Länge (100 b) usw. transkribiert würden, führt zu widersprüchlichen Ergebnissen, wenn z.B. nur eine Serie bis $n(7)$ betrachtet wird.

In Schema c) wird versucht, den höheren Einbau auf längeren Ketten über zusätzliche Initiationen in den linker Regionen zu erklären, was auch zu einem, allerdings anders, gebänderten Transkriptmuster führen würde, als es in Abb. 44 beobachtet worden war. Die berechneten Verhältnisse entsprechen nicht den experimentellen Daten.

Zur Erklärung der experimentellen Daten wird hier vorgeschlagen, daß selbst unter Enzymüberschuß (bis zu einem untersuchten P/T Verhältnis von 36 in Abb. 50, entsprechend einem 10-fach molaren Überschuß über $n(1)$, einem 80-fachen über $n(8)$) die Zahl der auf Nukleosomen initiationsfähigen E. coli RNA Polymerasen gegenüber der Mononukleosomenkonzentration im Überschuß vorliegt. Dabei sollten weniger als 6% aller RNA Polymerase Moleküle in der Lage sein, auf Nukleosomen zu initiieren. Der Grenzwert von 5% berechnet sich aus der Annahme, daß bei einer Serie von Oligonukleosomen bis $i = 8$, bei Sättigung ($P/T = 16$)

maximal 12,5 % (100 : 8) aller Polymerasen initiationsfähig sein sollten. Da Experimente bis zu einem P/T Wert von 36 (entsprechend etwa einer doppelten Sättigung) durchgeführt worden waren (s. Tabelle 23), ohne daß sich an der Produktstöchiometrie etwas geändert hätte, mußte sich der Prozentanteil der initiationsfähigen Polymerasen nochmals um einen Faktor 2 auf etwa 6 % reduzieren. 6 % ist ein Maximalwert. Die gefundene Beziehung zwischen Plateauinkorporation und Kettenlängenindex i wäre, wie Abb. 51 zeigt, auch bei allen kleineren Werten zu erwarten.

Da nach Abb. 44 nur an den Enden der templates initiiert wurde, scheint nur ein Bruchteil aller Moleküle in den verwendeten *E. coli* Polymerase Präparationen in der Lage gewesen zu sein, an den durch *Micrococcus* Nuklease gesetzten Schnittstellen zu initiieren (s.u.).

Daß nur ein Bruchteil der eingesetzten DNA tatsächlich transkribiert wurde, ergibt sich aus der Menge an synthetisierter RNA. Sie machte bei Mononukleosomen in Tabelle 20 5,5, in Tabelle 21 3,3 und in Tabelle 23 2 % der eingesetzten DNA Menge aus. Die Hypothese wird somit auch experimentell bestätigt.

Woran liegt die Heterogenität der Polymerasepräparation ? Der ϕ -Faktor der *E. coli* Polymerase bietet sich zur Erklärung an. Hinkle et al. (1972) berichteten, daß Einzelstrangbrüche in T7 DNA eine Stimulierung der Transkription durch das core Enzym, aber eine Inhibierung des Holoenzym bewirken.

Abb. 52 a) zeigt die auf einem SDS Gel aufgetrennten Untereinheiten der in dieser Arbeit verwendeten Chargen von *E. coli* RNA Polymerasen (Geschenke von Prof. Zillig). Die densitometrische Auswertung der Gelspuren, (z.B. Abb. 52 b) erbrachte ein mittleres $\beta + \beta' / \phi$ Verhältnis von 3,41 (der erwartete Wert bei einem 100 % Gehalt ist 3,37). Die statistische Schwankung der Messung ließ einen Gehalt von etwa 90 % zu.

Es ist somit wahrscheinlich, daß nur das core-, nicht aber das Holoenzym in der Lage ist, Nukleosomen zu transkribieren.



Abb. 52 SDS Gelelektrophorese von E. coli RNA Polymerase

20 - 40 µg Enzym wurden wie im Methodenteil beschrieben mit TCA gefällt und auf einem 10 % PAA SDS Gel elektrophoretisiert. Färben und Entfärben s. II,2.3.2.

Die densitometrische Auswertung wurde mit einem Elscript 2 (Fa. Hirschmann, München) vorgenommen.

Micrococcus Nuklease macht "staggered cuts" : die Schnittstellen auf den beiden gegenüberliegenden DNA Strängen sind um 2 Basen versetzt. Es entstehen Fragmente, in denen das 5' Ende mit einer freien 5' OH Gruppe um 2 Basen übersteht (Sollner-Webb et al., 1978). Während für 3' terminal überstehende Einzelstränge bekannt ist, daß sie als artifizielle Initiationsstellen dienen können (Nohara et al., 1973; Lilley u. Houghton, 1979), scheint dies für 5' "frayed ends" noch ungeklärt (Dezelee et al., 1974). Das hier gefundene Transkriptionsverhalten läßt aber vermuten, daß auch die Schnittstellen der Micrococcus Nuklease artifizielle Initiationsorte darstellen.

Die Transkription der vollen Länge der DNA in n(1) und D(1) ist sowohl von E. coli Polymerase wie von Weizenkeim Pol B berichtet worden (Bustin, 1978; Shaw et al., 1978; Lilley et al., 1979). Dabei fanden Shaw et al. (1978) mit E. coli Pol auf n(1) und D(1) noch diskrete Banden subnukleosomaler Länge.

Die Synthese von Transkripten voller Länge auch auf n(8) und D(8) innerhalb von 15 min erlaubt die Bestimmung einer Mindesttranskriptionsgeschwindigkeit von $8 \cdot 200 / 15 \cdot 60 = 1,8$ b/s. Ein ähnlicher Wert läßt sich aus den Daten von Shaw et al. (1978), die unter ähnlichen Ionenbedingungen erhalten wurden, berechnen. Dagegen benötigt die E. coli Polymerase unter den Bedingungen von Bustin (1978) mindestens 30 min, um RNA mit 150 b von Mononukleosomen zu transkribieren (etwa 0,1 b/s). Es ist möglich, daß die wesentlich niedrigere Ionenstärke bei Bustin (1978) für den Unterschied verantwortlich ist.

2.7 Transkription von template Verdünnungsreihen bei erlaubter Reinitiation. Vergleich von Polymerase B mit E. coli RNA Polymerase

Dieser Typ von Experimenten wurde gemacht, um quasi unter steady state Bedingungen, kinetische Daten über die Transkription von Nukleosomen und die daraus extrahierte DNA zu erhalten. Die Inkorporation während der ersten 10 min der Transkription wurde als Anfangsgeschwindigkeit gewertet. Die Reaktion verlief in diesem Zeitraum linear (s. Abb. 41 und 42).

Wie die Abbildungen des vorliegenden Abschnittes zeigen, bestand zwischen der Anfangsgeschwindigkeit und der template Konzentration näherungsweise ein hyperbolischer Zusammenhang, so daß es möglich war, die Kurven mit einem Lineweaver Burk plot zu linearisieren. Die doppelt reziproke Auftragung zeigte aber, deutlicher als die direkte graphische Auftragung, daß insbesondere im Bereich geringer template Konzentrationen die Punkte der Primärplots häufig durch eine sigmoide Kurve besser angepaßt waren.

Vier Transkriptionskombinationen wurden untersucht : E. coli Polymerase auf $n(i)$ und $D(i)$, Polymerase B auf $n(i)$ und $D(i)$.

Über 20 Experimentalserien wurden durchgeführt, um das gefundenen unterschiedliche Transkriptionsverhalten der beiden Polymerase zu reproduzieren. Nur 6 davon werden hier gezeigt, wobei die Auswahl repräsentativ ist, auch was die Schwierigkeiten bei der Auswertung der Experimente angeht.

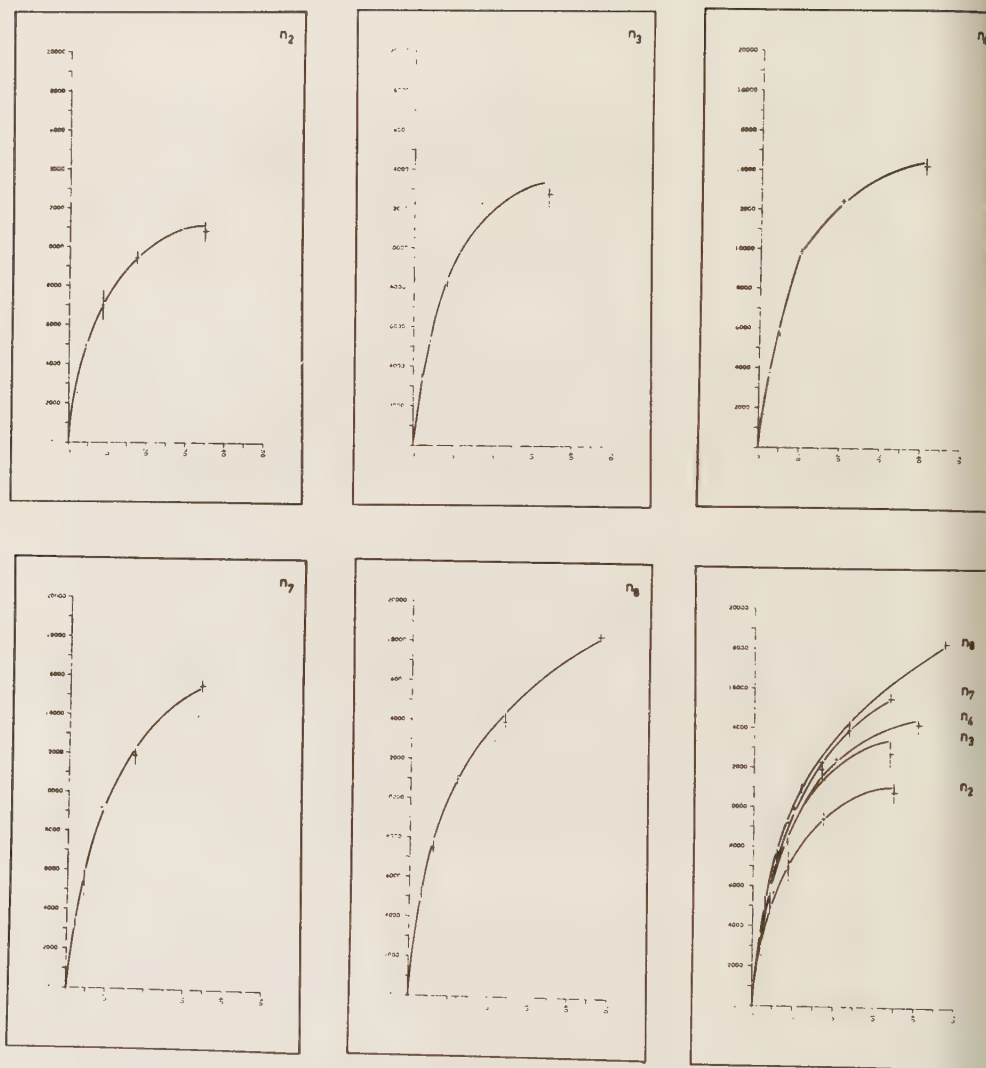
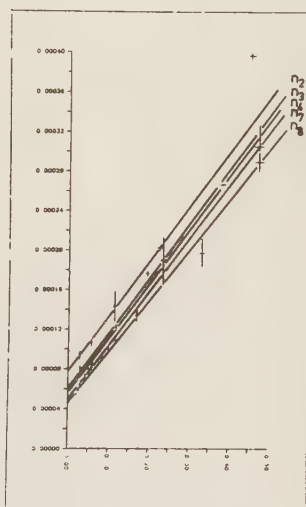
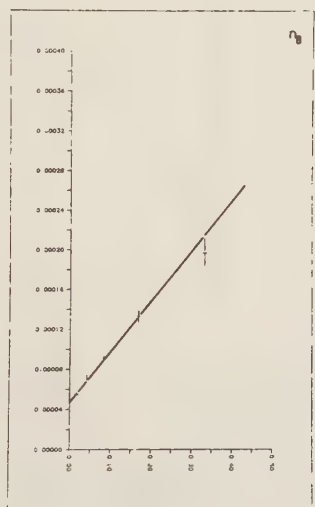
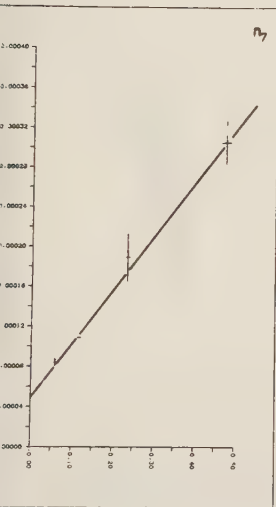
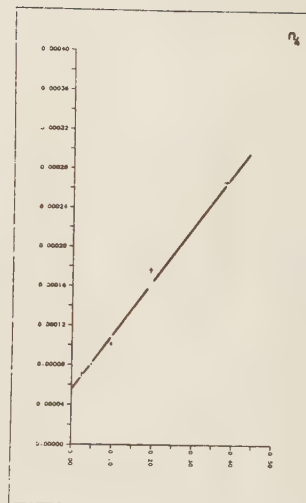
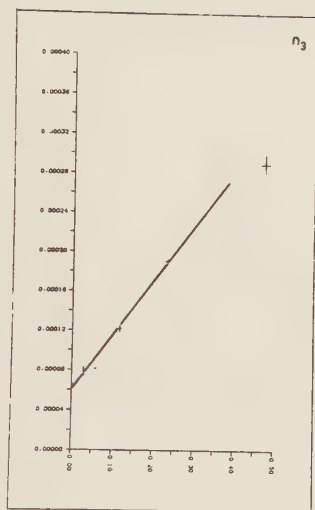
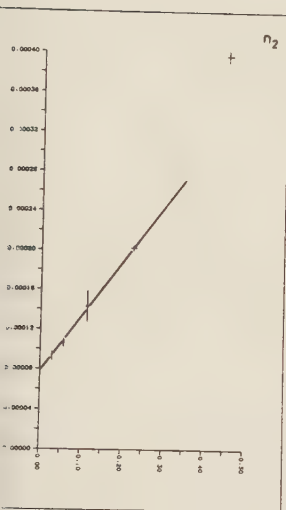


Abb. 53 Transkription von template Verdünnungsreihen.
E. coli RNA Polymerase auf Oligonukleosomen.

Die in den Abbildungen genannten Oligonukleosomen wurden in Testsystem 1 transkribiert. Das Enzym hatte eine Ausgangskonzentration von 340 ug/ml in Einfrierpuffer (s.II,2.1.1). Die Nukleosomen befanden sich in 0,2 mM EDTA, 1 mM NaCl, pH 7,0.

a) Abszisse : template Ausgangskonzentration [ug/ml]
Ordinate : [cpm]



b) doppelt reziproke Auftragung

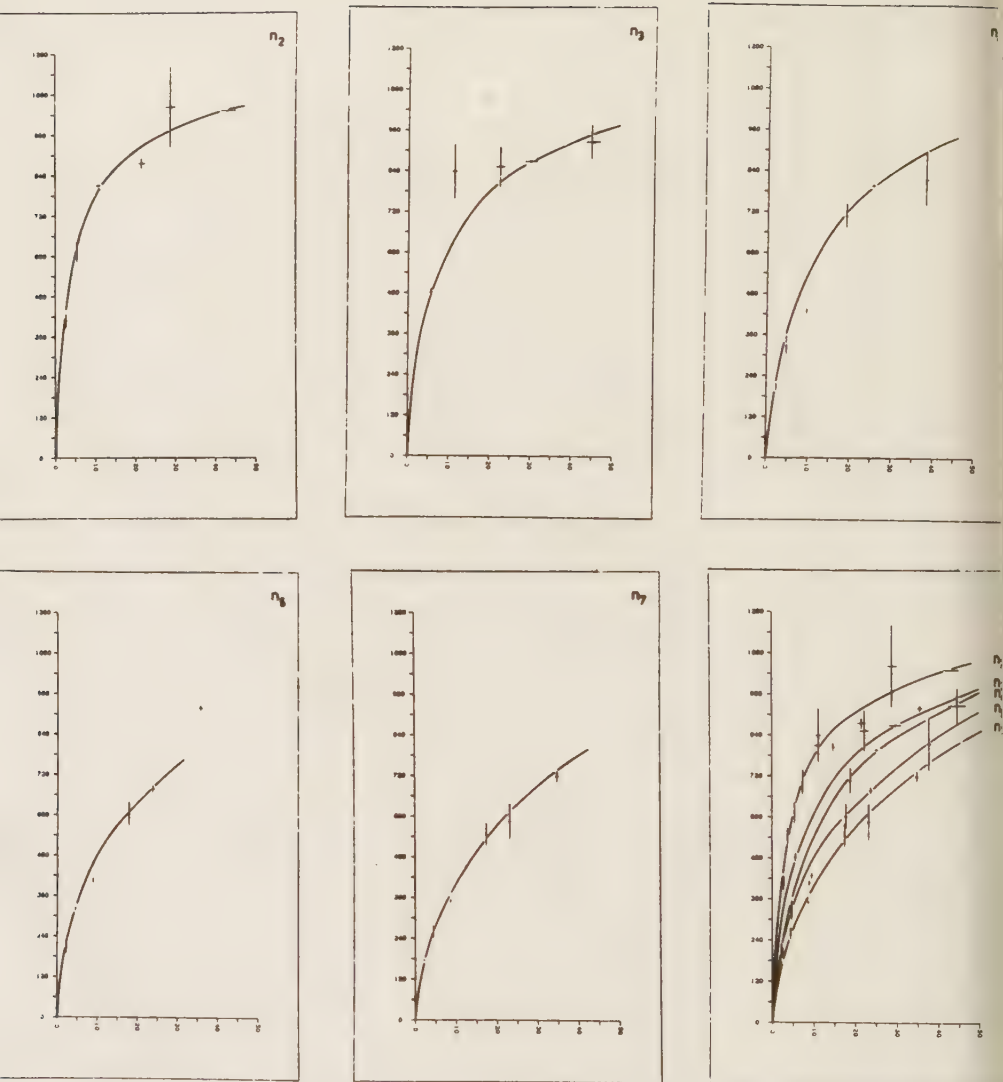
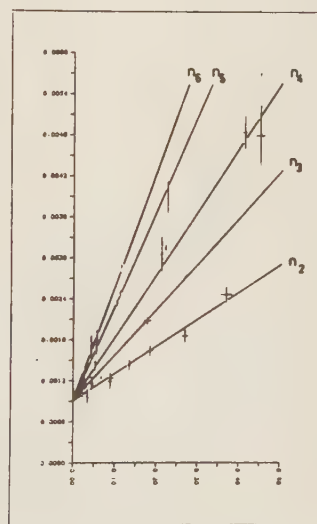
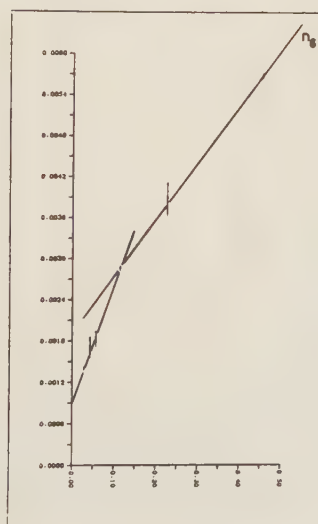
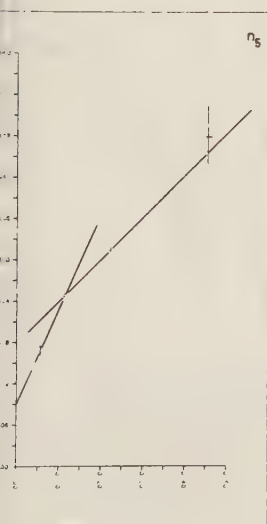
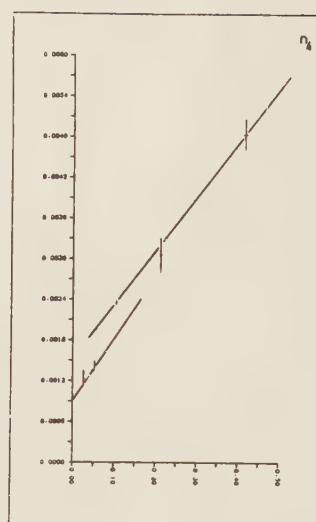
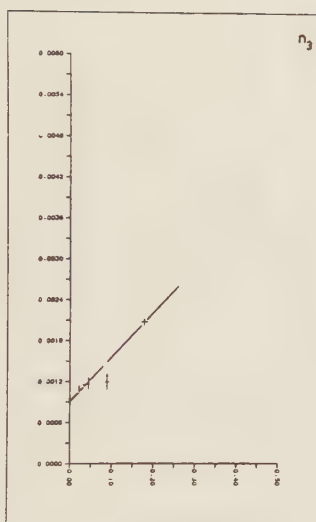


Abb. 54 Transkription von template Verdünnungsreihen.
Polymerase B auf Oligonukleosomen.

Die in den Abbildungen genannten Oligonukleosomen wurden in Testsystem 2 transkribiert. Pro Test wurden 0,27 u (1,4 μ g) Enzym in Puffer B(177) (s. II,2.1.5) eingesetzt. Die Salzkonzentration im Test betrug 44 mM AS. Die Nukleosomen befanden sich in 5 mM TEA, 10 mM Ammoniumchlorid, 0,2 mM EDTA, pH 7,9.

a) Abszisse : template Ausgangskonzentration [μ g/ml]
Ordinate : [cpm]



b) doppelt reziproke Auftragung

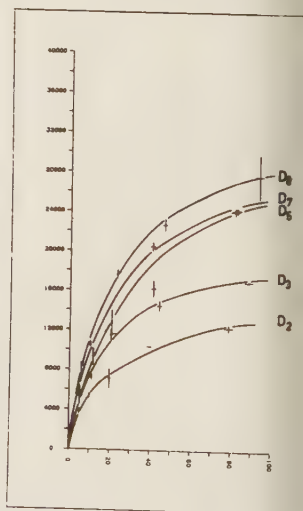
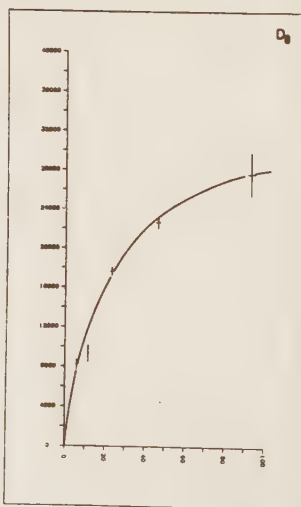
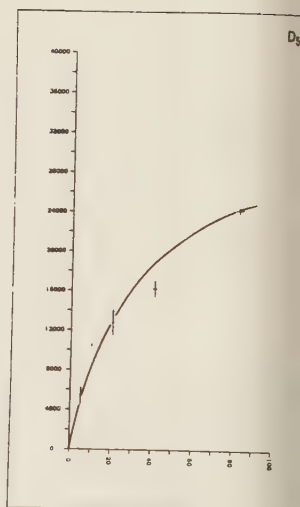
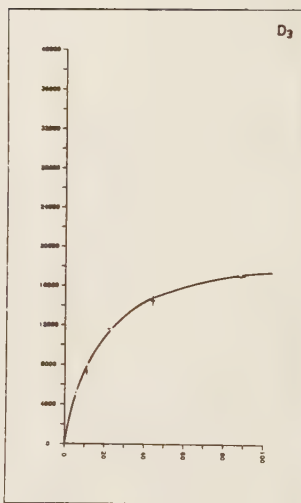
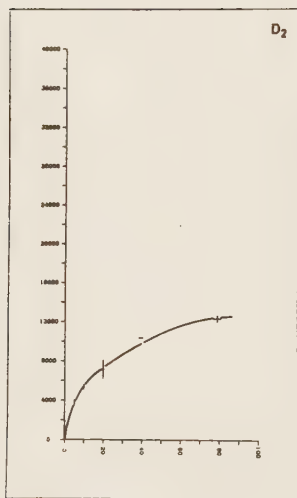
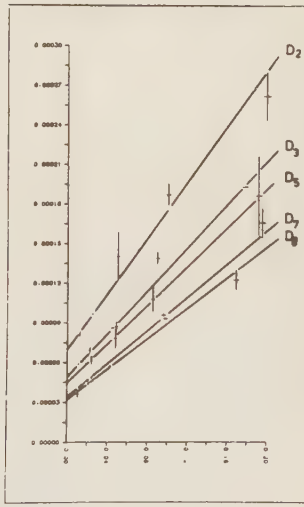
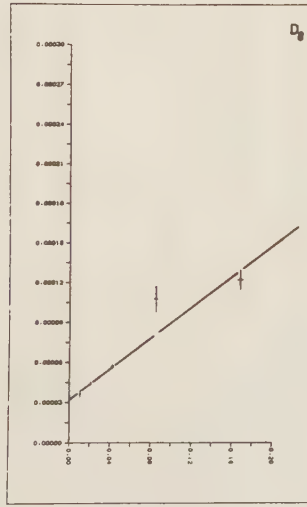
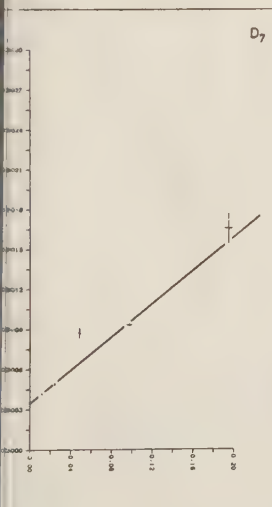
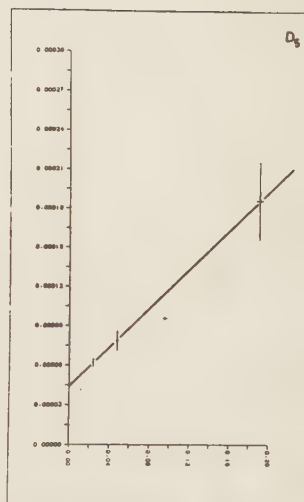
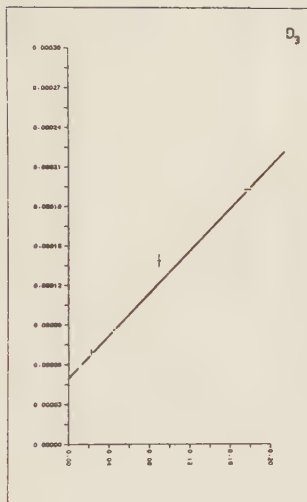
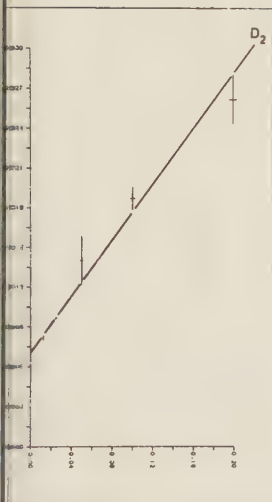


Abb. 55 Transkription von template Verdünnungsreihen.
E. coli RNA Polymerase auf DNA Fragmenten.

Die in den Abbildungen genannten DNA Fragmente wurden unter den in Abb. 53 genannten Bedingungen transkribiert.

a) Abszisse : template Ausgangskonzentration [$\mu\text{g/ml}$]
Ordinate : [cpm]



b) doppelt reziproke Auftragung

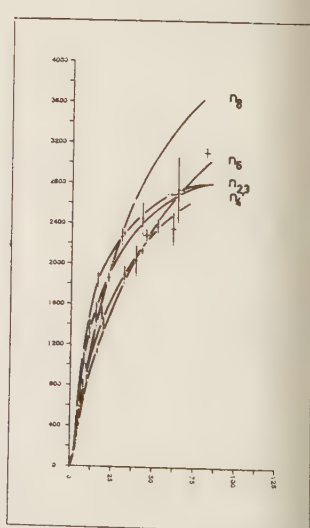
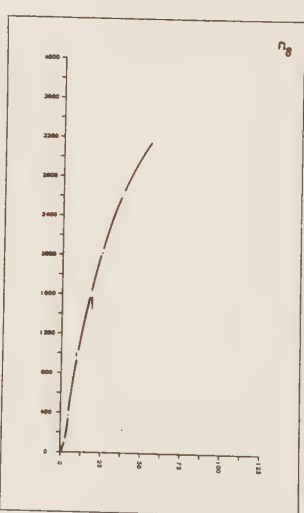
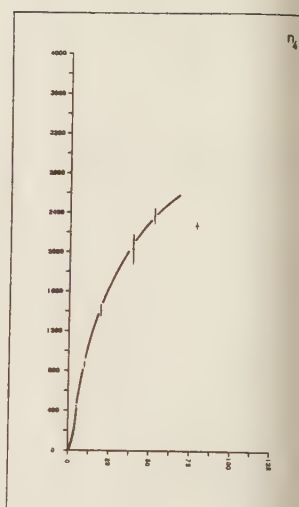
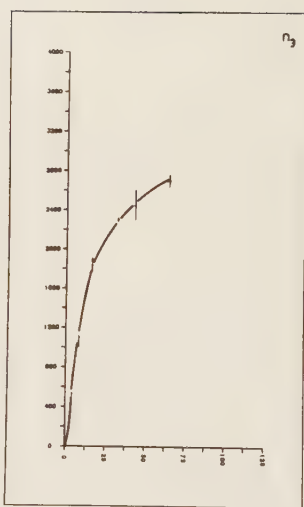
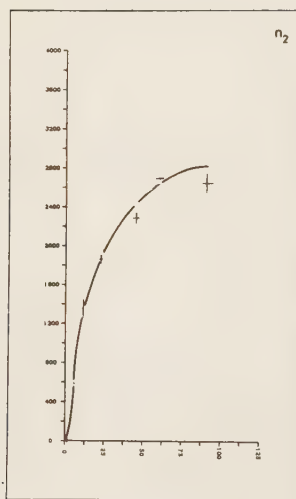
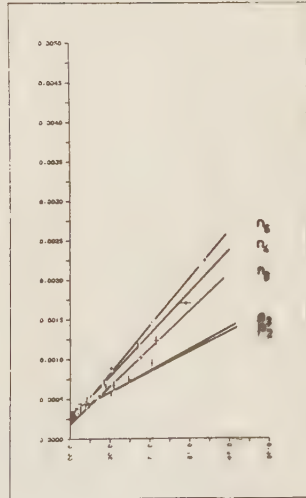
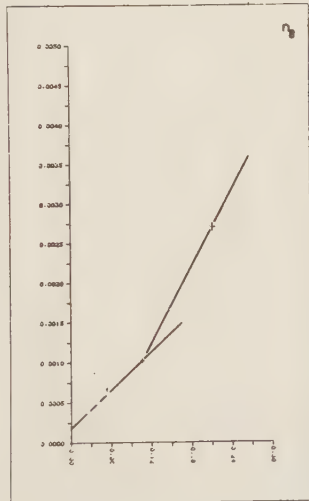
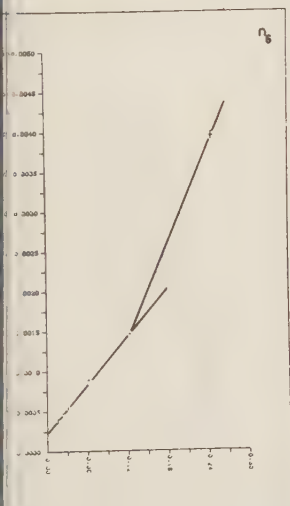
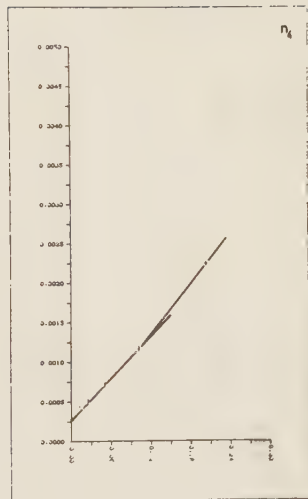
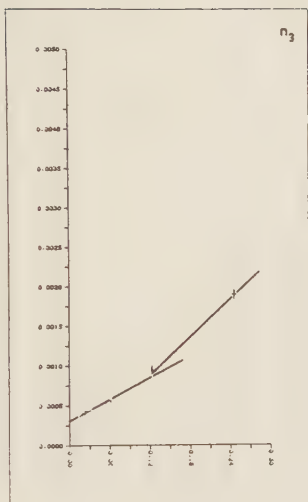
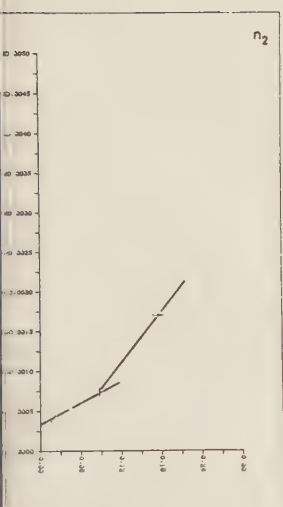


Abb. 56 Transkription von template Verdünnungsreihen.
E. coli RNA Polymerase auf Oligonukleosomen.

Die in den Abbildungen genannten Oligonukleosomen wurden in Testsystem 2 transkribiert. Das Enzym hatte eine Ausgangskonzentration von 100 µg/ml in Puffer B(340) (s. II, 2.1.5). Die Nukleosomen befanden sich in 1 mM Tris, 40 mM NaCl, 0,2 mM EDTA, pH 8,0. Die Salzkonzentration im Test betrug 85 mM AS, 16 mM NaCl.

a) Abszisse : template Ausgangskonzentration [µg/ml]
Ordinate : [cpm]



b) doppelt reziproke Auftragung

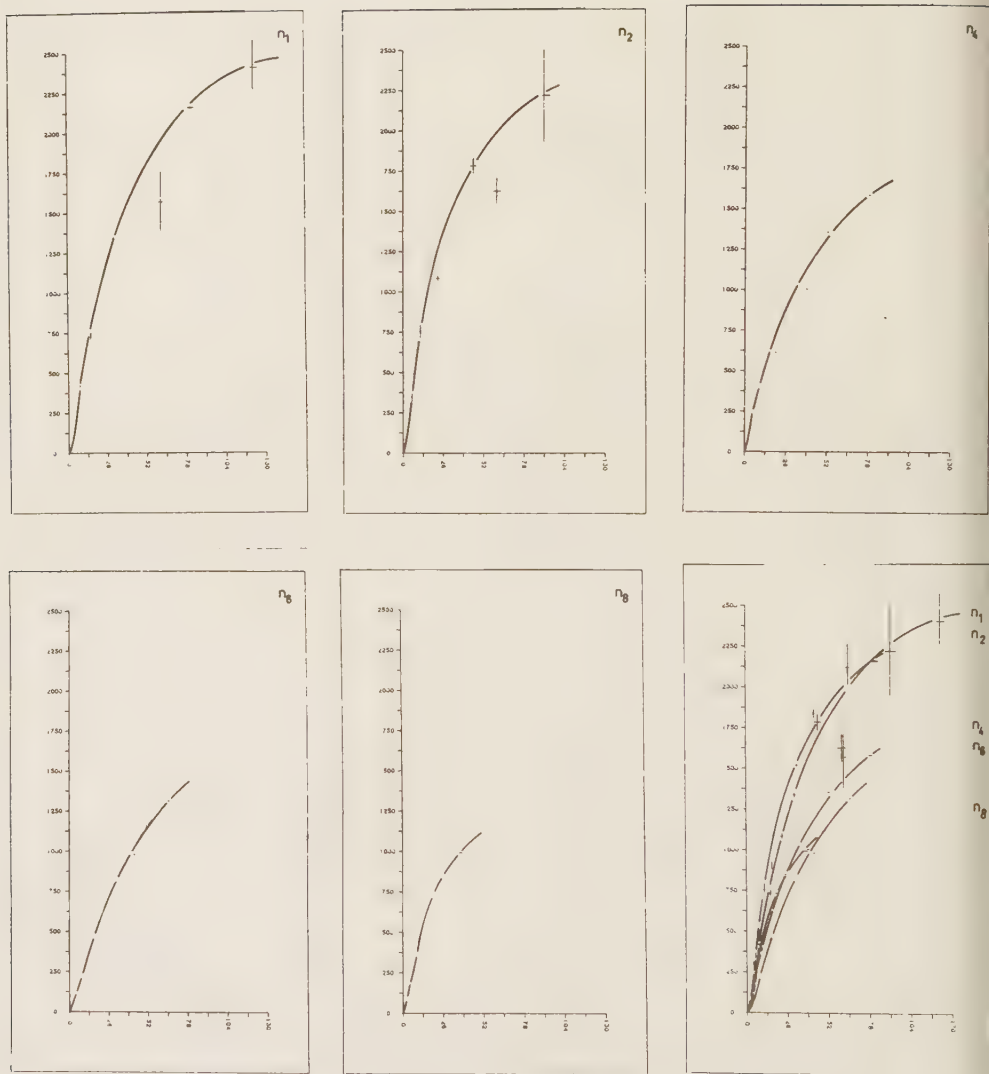
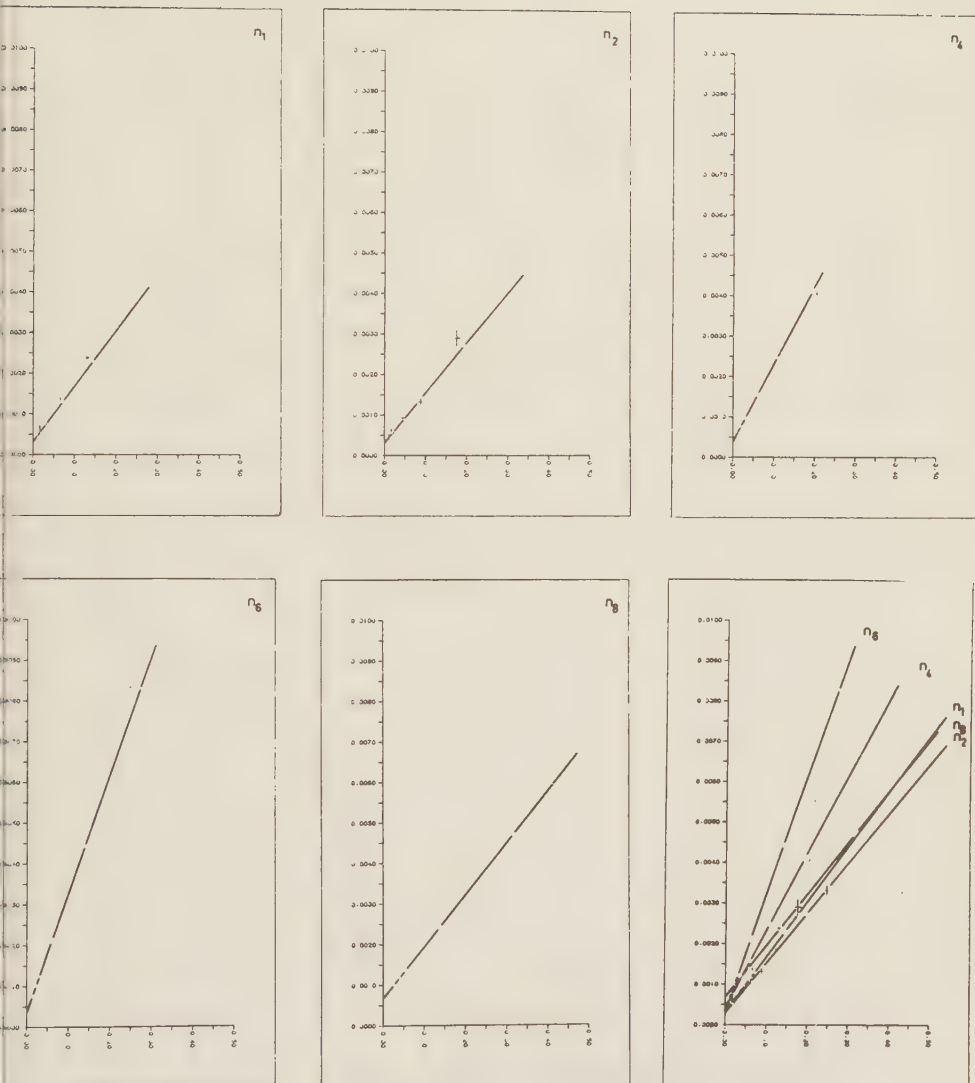


Abb. 57 Transkription von template Verdünnungsreihen.
Polymerase B auf Oligonukleosomen.

Die in den Abbildungen genannten Oligonukleosomen wurden unter den in Abb. 56 genannten Bedingungen transkribiert. Pro Test wurden 0,085 u (0,4 µg) Enzym eingesetzt.

a) Abszisse : template Ausgangskonzentration [µg/ml]
Ordinate : [cpm]



b) doppelt reziproke Auftragung

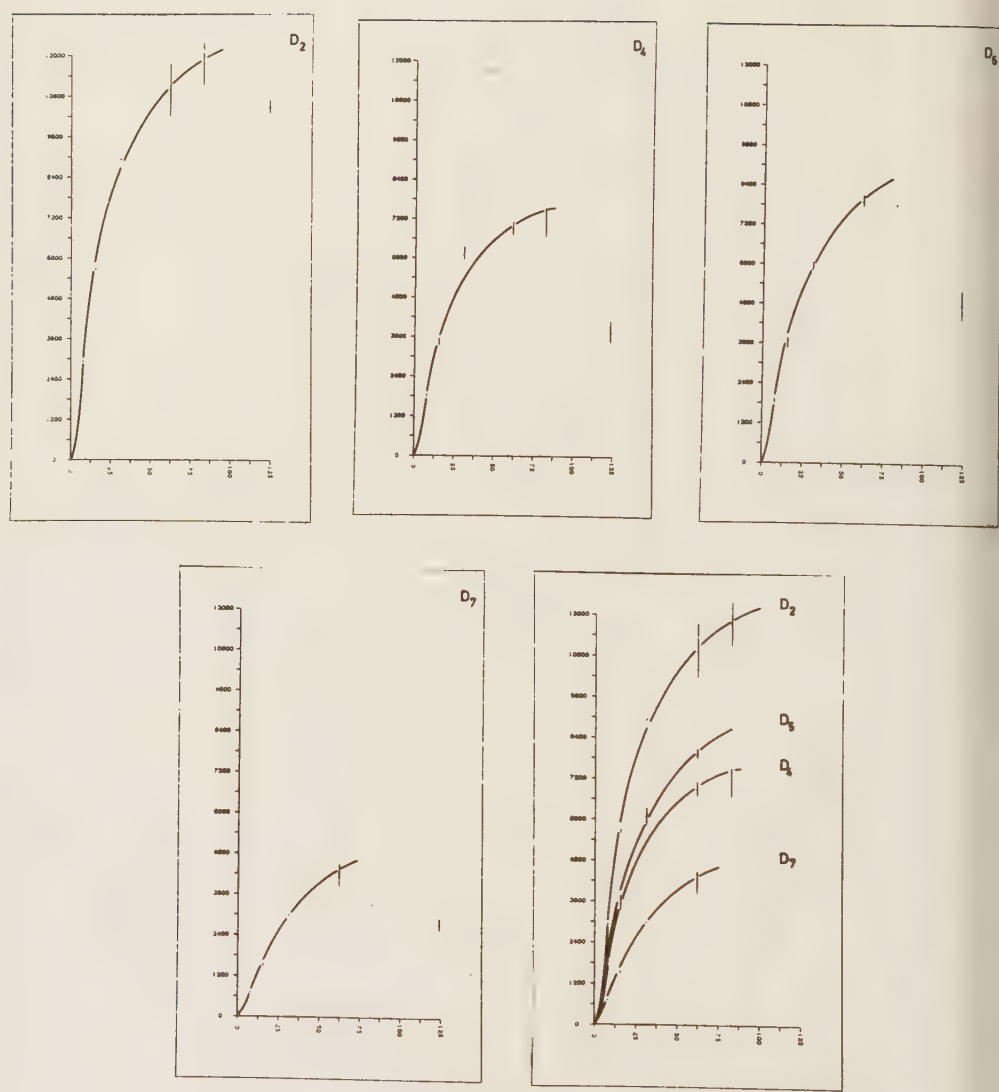
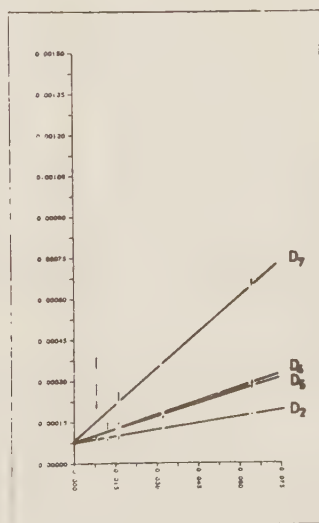
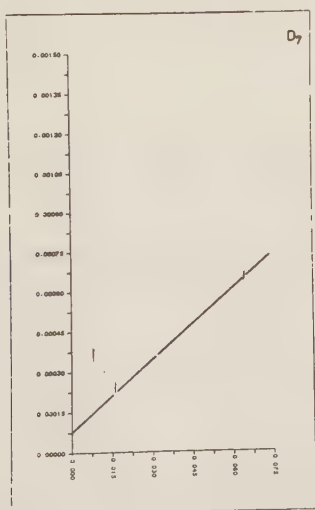
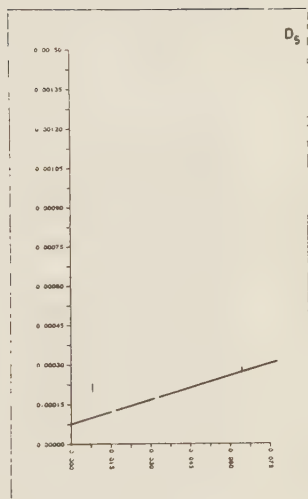
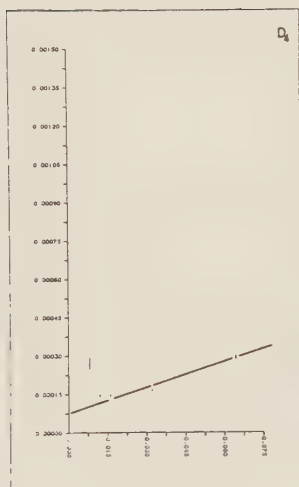
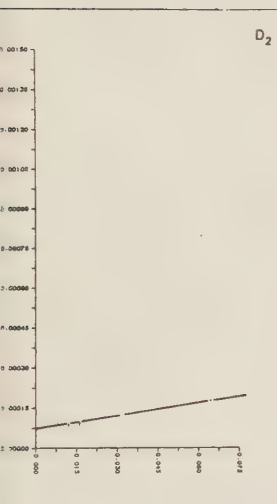


Abb. 58 Transkription von template Verdünnungsreihen.
Polymerase B auf DNA Fragmenten.

Die in den Abbildungen genannten DNA Fragmente wurden unter den in Abb. 57 genannten Bedingungen transkribiert.
a) Abszisse : template Ausgangskonzentration [ug/ml]
Ordinate : [cpm]



b) doppelt reziproke Auftragung

Hyperbolische Kurven ergeben bei doppelt reziproker Auftragung eine Gerade. Ein im Primärplot (cpm vs. ug/ml template) sigmoider Kurvenverlauf ergibt bei doppelt reziproker Auftragung eine Abweichung von der Linearität. In vielen Experimenten (z.B. Abb. 56,57,58) konnten daher Werte, die bei geringer template Konzentration bestimmt worden waren, nicht zur Extrapolation gegen ml/ug = 0 verwendet werden. In einigen Fällen kam noch eine Inhibition der Reaktion bei hohen template Konzentrationen hinzu (z.B. Abb. 58), was eine Extrapolation weiter erschwerte. Wegen dieser Unsicherheiten bei der Extrapolation wurde auf eine quantitative Auswertung der Daten, z.B. Bestimmung von Steigungen und Achsenabschnitten verzichtet. Der Grad der Sigmoidizität war in verschiedenen Experimenten unterschiedlich. Die weiter unten aufgezählten Charakteristika stützen sich vornehmlich auf Experimente, die einen deutlich hyperbolischen Kurvenverlauf erbrachten. Zur graphischen Auswertung wurden in allen Fällen die Fehlergrenzen bei der Bestimmung der template Konzentration und der säurefällbaren Radioaktivität sowohl im direkten, wie im doppelt reziproken plot mitberücksichtigt. Die Daten wurden dazu in ein VAX/VMS Computersystem eingegeben (digital equipment corporation, Maynard, Mass., USA), nach Bedarf transformiert und mit einem Calcomb plotter maschinell gezeichnet. Folgende qualitative Beobachtungen wurden an den Graphen gemacht :

1. Doppelt reziproke Auftragungen ergaben bei gleicher RNA Polymerase für n(i) und D(i) ein ähnliches Muster. Mit Pol B konvergierten die Anfangsgeschwindigkeiten mit steigender template Konzentration für alle i auf einen gemeinsamen Grenzwert (V(max)) (Abb. 54, 57, 58). Mit E. coli Pol ergab die Extrapolation für verschiedene i verschiedene Grenzwerte (Abb. 53, 55, 56). Die Kurvenscharen, die in der Lineweaver Burk Auftragung gefunden wurden, haben in der Enzymkinetik Bedeutung für die Analyse inhibierter Enzymreaktionen. Das Muster der Kurvenschar ermöglicht dabei die phänomenologische Klassifikation des Inhibitionstypus. Die Kurven ließen sich, unabhängig von Polymerase oder template, soweit sie hyperbolisch waren, durch eine verallgemeinerte Michaelis Menten Gleichung beschreiben, wie sie häufig von reversibel inhibierten Enzymreaktionen befolgt wird.

$$v = \frac{V_m \cdot S}{K \cdot (1 + f_1(i)) + S \cdot (1 + f_2(i))}$$

Während f1(i) und f2(i) normalerweise Funktionen der InhibitorKonzentration sind, sind sie im vorliegenden Fall Funktionen des nukleosomalen Kettenlängenindex i. S entspricht der template Konzentration.

Es sei betont, daß die Gleichung zunächst nur die phänomenologische Beschreibung der Transkription von templates verschiedener Kettenlänge erlaubt. In der Enzymkinetik werden im Lineweaver Burk plot Kurvenscharen von inhibierten Enzymreaktionen, die im Ordinatenabschnitt konvergieren als

"kompetitiv", solche mit gleicher Steigung als "antikompetitiv" bezeichnet. Die Analogie zwischen Kettenlängenindex i und einer Inhibitorkonzentration soll hier nicht weiter ausgebaut werden. Die Graphiken zeigen aber, daß das komplexe kinetische Geschehen in erster Näherung einer einfachen formellen Behandlung zugänglich ist.

2. Pol B transkribierte kurze Ketten besser als lange, unabhängig davon ob Serien von $n(i)$ oder $D(i)$ verwendet wurden (Abb. 54, 57, 58). Für E. coli Pol galt das umgekehrte (Abb. 53, 55, 56).

3. Die Transkriptionseffizienz (nMol RNA / nMol template-DNA) stieg mit steigenden P/T Verhältnis. Die maximale Transkriptionseffizienz, die in den Versuchen erreicht wurde lag für E. coli Pol bei 1 (Abb. 61), für Pol B bei 0,3 (Abb. 62).

Wird die Transkriptionseffizienz auf Nukleosomen bzw auf DNA bei gleicher Kettenlänge und gleichem P/T Verhältnis verglichen, so gelangt man zu der Schlußfolgerung, die schon aus Abb. 40 gezogen worden war: E. coli Pol transkribiert $n(i)$ und $D(i)$ etwa gleich effizient. Dagegen transkribiert Pol B auf $n(i)$ 8 - 10 mal weniger RNA als auf der gleichen Menge DNA. In Abb. 61 wurde mit E. coli Pol ein RNA/DNA Massenverhältnis von 1 bei hohem P/T Verhältnis in 10 min erreicht. Wurde die Reaktion bei geringeren P/T Verhältnissen länger fortgeführt (z.B. 120 min in Abb. 42a), so überschritt auch hier die Menge an synthetisierter RNA die eingesetzte template Menge nicht (In Abb. 42a) waren $n(8)$, $n(6)$, $n(4)$, $n(2)$ bei den P/T Verhältnissen 1,01; 1,24; 1,54; 1,96 120 min lang transkribiert worden. Pro nMol DNA waren 0,67; 0,75; 0,90; 0,61 nMol RNA synthetisiert worden). E. coli Pol schien somit nicht mehr RNA synthetisieren zu können, als an template vorgegeben worden war.

Die einfachste Interpretation dieses Sachverhaltes ist, daß E. coli Pol beide Stränge der DNA transkribierte, daß unter den Testbedingungen keine mehrfache Transkription eines template Moleküles stattfand, daß aber alle template Moleküle einmal transkribiert wurden. Lange Kinetiken, wie z.B. in Abb. 42a), wurden mit E. coli Pol nur bei molaren Verhältnissen von Polymerase zu template von größer als 1 durchgeführt. Würde man die mengenmäßig vollständige Transkription der templates auch bei Enzymunterschuß erreichen, könnte aus diesem Befund direkt gefolgert werden, daß E. coli Pol unter den Testbedingungen zur Reinitiation fähig ist. Die vorliegenden Daten lassen zunächst noch zwei Möglichkeiten zu:

1. Nach Beendigung der Reaktion bleibt ein ternärer Komplex aus template, RNA und RNA Pol zurück. E. coli Pol bleibt in diesem Komplex gebunden und steht für weitere Initiationen nicht zur Verfügung. Ein solcher Komplex wurde von Bremer u. Konrad (1964), allerdings für die Transkription bei geringen Ionenstärken beschrieben. Die hier gewählten Transkriptions-

bedingungen würden allerdings eine Reinitiation erwarten lassen (vgl. Fuchs et al., 1967).

2. Nach Beendigung der Reaktion bleibt das template in modifizierter Form zurück, so daß eine nochmalige Transkription unterbleibt. Die RNA Pol steht dagegen für neue Initiationen zur Verfügung. Eine einfache Form einer solchen Modifikation wäre ein Hybrid aus template und RNA. Einer mengenmäßig vollständigen Transkription der DNA entspräche eine vollständige Überführung der DNA in die Hybridform.

In Experimenten, in denen nach Vorinkubation die Reinitiation durch Rifampicin oder hohe Ionenstärke verhindert worden war wurde in 60 min und bei Enzymüberschuß nur 3,5 bis 25 % an RNA (bezogen auf die eingesetzte template Masse; die Ausbeuten waren kettenlängenabhängig) synthetisiert (vgl. Abb. 46a). Bei gleichem P/T Verhältnis, aber in Abwesenheit von Rifampicin, wurden bereits in 10 min 50 % der eingesetzten DNA Masse an RNA synthetisiert (Abb. 61a). Dieser Befund spricht für die Gültigkeit der zweiten Alternative. Reinitiation würde man auch nach der in 2.6 entwickelten Hypothese erwarten, wonach nur ein Bruchteil der E. coli Polymerasen zur Initiation auf den hier verwendeten templates fähig sein soll.

Daß nach der Transkription das template als Hybrid zurückbleibt, ist häufig beobachtet worden (z.B. Dezelee et al., 1974; Howk et al., 1974; Groner et al., 1975). Der Befund wurde von diesen Autoren als Transkription von Einzelstrang DNA gedeutet. Nach Dreyer u. Hausen (1976) ist ein hoher Anteil an RNase H - sensibler RNA aber eher ein Anzeichen für eine Initiation an artifiziellen Startpunkten (nicks). Wie die Diskussion in 2.6 zu zeigen versuchte, findet bei den untersuchten kurzen DNA Fragmenten Initiation nur an den artifiziellen Enden statt. Da der Doppelstrangcharakter nukleosomaler DNA mit vielen physikalisch- chemischen Methoden gezeigt worden ist (vgl. die einführende Literatur), kann angenommen werden, daß die artifizielle Natur der Initiation und Termination auf den hier verwendeten templates eine Reorganisation der DNA nach der Transkription nicht gestattet.

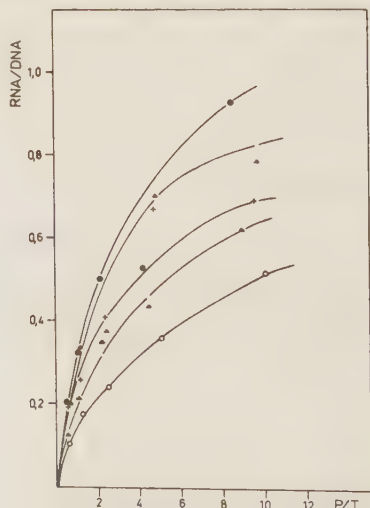
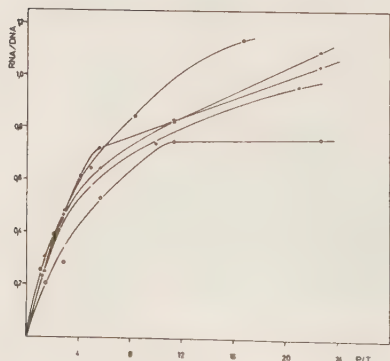


Abb. 59 Transkription von template Verdünnungsreihen mit E. coli RNA Polymerase. Abhängigkeit der RNA Ausbeute vom P/T Verhältnis.

Die Ausbeute an RNA wurde unter Annahme eine 25 % U Gehaltes des Transkripts berechnet. Angegeben ist das Massenverhältnis von synthetisierter RNA zu eingesetzter DNA.

a) replot von Abb. 53

b) replot von Abb. 55

○ — ○ 2, △ — △ 3, □ — □ 4,
+ — + 5, ▲ — ▲ 7, ● — ● 8.

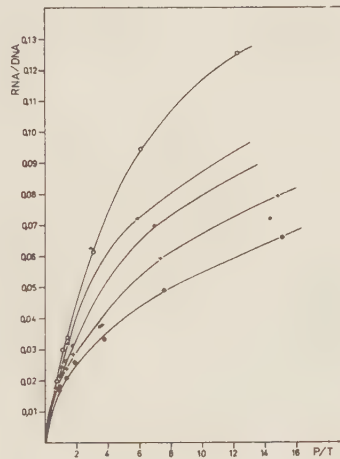
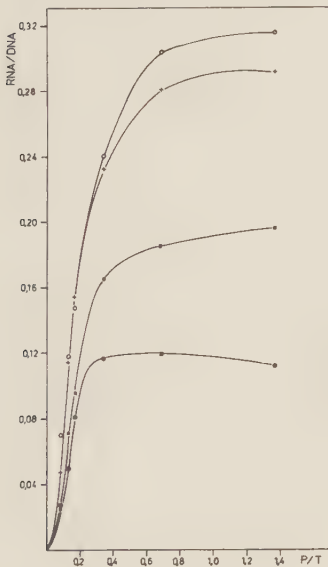


Abb. 60 Transkription von template Verdünnungsreihen mit Polymerase B. Abhängigkeit der RNA Ausbeute vom P/T Verhältnis.

Die Ausbeute an RNA wurde unter Annahme eine 25 % U Gehaltes des Transkripts berechnet. Angegeben ist das Massenverhältnis von synthetisierter RNA zu eingesetzter DNA.

a) replot von Abb. 58

b) replot von Abb. 54

○ — ○ 2, △ — △ 3, □ — □ 4, + — + 5, ● — ● 7.

Pol B transkribierte auf DNA mehr RNA als auf Nukleosomen. Dabei wurde in den Versuchen mit D(i) nur etwa ein drittel

der template Masse an RNA synthetisiert (Abb. 50). Aber auch in einem Versuch mit Kalbsthymus DNA ("nativ", Sigma) wurde nur ein RNA/DNA Verhältnis von 0,5 erreicht (Abb. 61). Es erscheint daher möglich, daß die Transkriptionsmechanismen für eukaryontische und bakterielle RNA Polymerasen verschieden sind. Der Wert von 0,5 suggeriert die vollständige Transkription nur eines DNA Stranges. Da in der vorliegenden Arbeit kaum Experimente mit nicht-nukleosomalen templates gemacht worden sind, sind die Daten dazu als nur vorläufig zu betrachten. Bei allen Vergleichen zwischen verschiedenen Kettenlängen, Polymerasen und template Arten, war stets eine etwa gleiche Basenzusammensetzung der Transkripte angenommen worden (25 % U). Starke Schwankungen im U - Gehalt würden neue Interpretationen notwendig machen. Die Möglichkeiten für eine solche Variabilität sind in 2.5.1 bereits diskutiert worden.

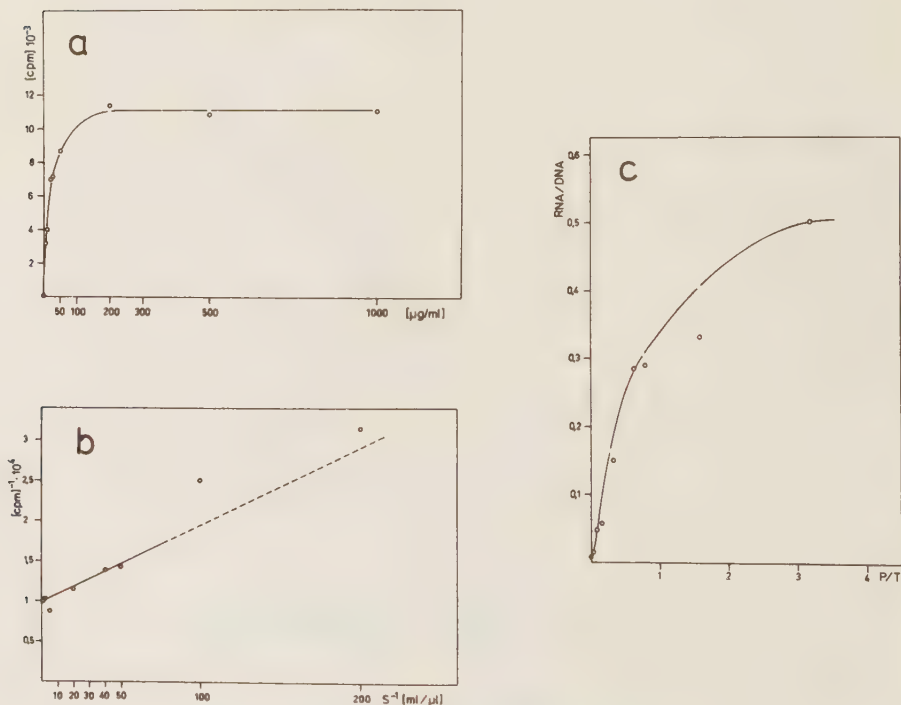


Abb. 61 Transkription von template Verdünnungsreihen. Polymerase B auf nativer Kalbsthymus DNA.

nCT DNA wurde in Testsystem 2 mit 0,15 u (0,64 ug) Pol P aus Rattenleber pro Test transkribiert. Die DNA befand sich in 0,2 mM EDTA, 1 mM NaCl, pH 7,0. Die Salzkonzentration im Test betrug 80 mM AS.

- a) Abszisse : template Ausgangskonzentration [ug/ml]
Ordinate : [cpm]
- b) doppelt reziproke Auftragung
- c) Abhängigkeit der RNA Ausbeute vom P/T Verhältnis.

Die Ausbeute an RNA wurde unter Annahme eine 25 % U Gehaltes des Transkripts berechnet. Angegeben ist das Massenverhältnis von synthetisierter RNA zu eingesetzter DNA.

In den Abbildungen 59 und 60 waren hohe P/T Verhältnisse durch hohe Verdünnungen des templates bei konstanter Enzymkonzentration bewerkstelligt worden. Biologische Makromoleküle sind in stark verdünnter Lösung denaturierenden Einflüssen stärker ausgesetzt als bei hoher Konzentration. Nach Lilley et al. (1979) besteht bei geringen Konzentrationen zudem die Gefahr einer Abdissoziation der DNA von den Nukleosomen. In anderen Versuchen wurden daher hohe P/T Werte durch hohe Enzymkonzentrationen eingestellt. Abb. 62 zeigt, daß die komplementäre Versuchsdurchführung gleiche Ergebnisse brachte. Nukleosomen wurden bei konstanter Konzentration mit zunehmenden Mengen an E. coli Polymerase transkribiert. Mit zunehmendem P/T Verhältnis strebte die pro Masseneinheit DNA synthetisierte RNA Menge ebenfalls einem Wert von 1 zu. Ebenfalls deutlich ist die stärkere Inkorporation auf längeren Nukleosomen.

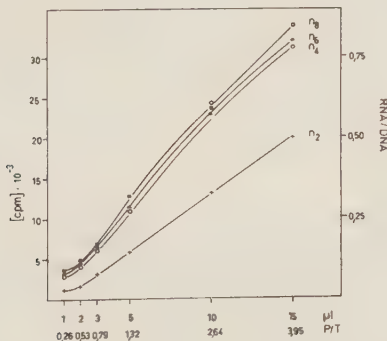


Abb. 62 Transkription von Oligonukleosomen bei verschiedenen E. coli Polymerase Konzentrationen.

Die angegebenen Oligonukleosomen wurden bei einer einheitlichen Ausgangskonzentration von 25,8 ug/ml mit den angegebenen

Volumina an Enzym (340 ug/ml in Wasser) transkribiert. Die zweite Abszissenzeile und die rechte Ordinate geben die Abhängigkeit der RNA Ausbeute vom P/T Verhältnis. Die Ausbeute an RNA wurde unter Annahme eine 25 % U Gehaltes des Transkripts berechnet. Angegeben ist das Massenverhältnis von synthetisierter RNA zu eingesetzter DNA.

Die stärkere Inkorporation mit E. coli Polymerase auf langen n(i) und D(i) verglichen mit kurzen wird plausibel durch die Annahmen, daß unter den angewandten Transkriptionsbedingungen ein Enzymunterschuß vorlag (vgl. 2.6) und daß daher zur vollständigen Transkription des templates Reinitiationen notwendig waren (s.o.). Wenn die Initiation (oder Termination) verglichen mit der Elongation ein langsamer Prozeß ist (vgl. 2.5.3), wird sie geschwindigkeitsbestimmend. Um auf kürzeren Fragmenten eine gleich hohe Inkorporation wie auf langen zu bekommen, muß auf den kurzen Fragmenten öfter initiiert (oder terminiert) werden. Wenn die Initiationsfrequenz auf verschiedenen template Längen etwa gleich ist, bedeutet dies eine mit i zunehmende Inkorporation, was beobachtet wurde.

Über die Frage, warum Pol B gerade die umgekehrte Längenpräferenz aufweist, kann hier nur spekuliert werden. Pol B könnte anders als das heterologe bakterielle Enzym in der Lage sein, Initiationssequenzen auf den DNA Fragmenten zu erkennen. Wie in IIIA,2.2 beschrieben wurde, reichern sich Sequenzen aus (potentiell) transkriptionell aktiven Bereichen des Genoms bei kurzen Oligonukleosomen an. Dies könnte die präferentielle Transkription kurzer Fragmente erklären. Kittlaus (1980) beobachtete eine ungleiche Verteilung H1 - artiger NHCP auf verschiedenen nukleosomalen Kettenlängen. Es wäre denkbar, daß durch sie das Transkriptionsverhalten der Polymerasen (unterschiedlich) moduliert würde.

2.8 Transkription mit Polymerase B in Gegenwart von Rifamycin AF/013

Rifampicin und Rifamycin AF/013 sind Rifamycin Derivate. E. coli RNA Polymerase wird durch beide Verbindungen inhibiert, eukaryontische RNA Polymerasen nur durch AF/013. Der Wirkmechanismus von AF/013 und anderen O-Alkyl-formylloxim Derivaten des Rifamycins ist gründlich untersucht (Meilhac et al.,1972; Butterworth et al.,1971; Juhasz et al.,1972; Riva et al.,1972; Onishi u. Muramatsu,1972; diMauro u. Mezzina,1974; Rose et al.,1975). Anders als Rifampicin verhindert AF/013 bereits das Binden der Polymerase an das template, wirkt dadurch aber ebenfalls als Initiationsinhibitor. Während Rifampicin die Elongation nicht beeinflusst, reduziert AF/013 die Kettenlänge der Transkripte (Juhasz et al.,1972; Tsai u. Saunders,1973).

AF/013 kann möglicherweise, anders als Rifampicin, auch RNA Polymerasen in aktiven Transkriptionskomplexen inaktivieren (Rose et al., 1975). Bei inhibierenden Konzentrationen seien mehrere hundert AF/013-Moleküle an die RNA Polymerase gebunden (Riva et al., 1972). Lilley et al. (1979) beobachteten; daß AF/013 zu einem Zerfall von Mononukleosomen führte.

AF/013 erschien daher wenig geeignet, eine Trennung von Initiation und Elongation bei der Transkription mit Polymerase B zu bewerkstelligen. Nur wenige Experimente mit AF/013 wurden deshalb durchgeführt. Dabei wurde kaum ein Einfluß der template Konzentration oder der Art des templates auf die Inhibition durch AF/013 gefunden.

Abb. 63a) zeigt die Abhängigkeit der Transkription von der AF/013 Konzentration. Bei Verwendung nukleosomaler templates wurde in allen Fällen eine anfängliche Stimulierung der Transkription beobachtet. Eine Stimulierung der Transkription, insbesondere der endogenen RNA Polymerase auf Chromatin ist auch aus der Literatur bekannt (Butterworth et al., 1971; Davies u. Walker, 1977; Thomas et al., 1977). Möglicherweise wird durch die Entfernung von Proteinen oder durch eine Änderung der Nukleosomenstruktur bei diesen nicht-inhibierenden AF/013 Konzentrationen die Transkription erleichtert.

In Abb. 63b) wird die Inhibition der Transkription auf D(6) bei zwei verschiedenen template Konzentrationen verglichen. Die Prozentauftragung in Abb. 63c) zeigt, daß der Inhibitionsverlauf für die beiden verschiedenen Konzentrationen, bis auf eine leicht erhöhte Resistenz bei der höheren template Konzentration, sehr ähnlich war. Das höhere Angebot an template beschleunigte möglicherweise die Initiation und bewirkte dadurch eine vermehrte Transkription in Gegenwart von AF/013.

Die relative Zählausbeute nahm mit zunehmender AF/013 Konzentration weitaus langsamer ab als die RNA Synthese. Ein Farbquench durch die rötliche Verbindung, die nach TCA Fällung teilweise auf Nitrocellulosefiltern zurückgehalten wurde, war somit für die beobachteten Effekte nicht verantwortlich.

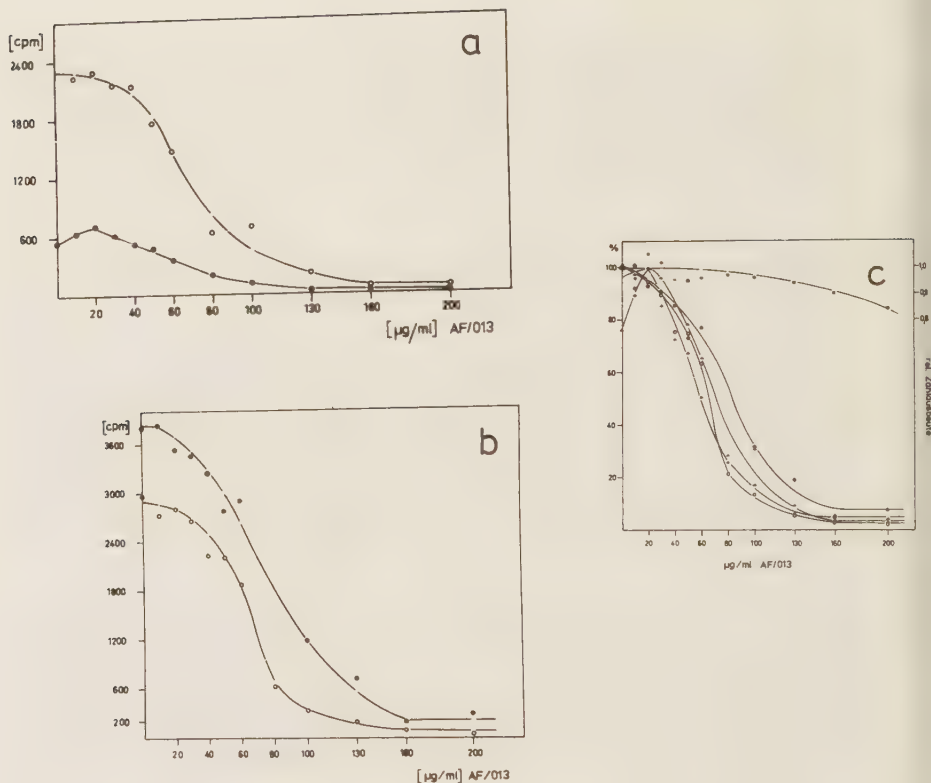


Abb. 63 Transkription mit Polymerase B in Gegenwart von Rifamycin AF/013

a) Vergleich der Transkription auf n(i) und D(i).

n(3) und D(3) wurden in einer Konzentration von 9,75 μg/ml mit 0,12 u (0,6 μg) Pol B im Testsystem 5a bei einer Salzkonzentration von 27 mM AS transkribiert.

○ — D(3), ● — n(3)

b) Vergleich der Transkription bei unterschiedlicher DN Konzentration

D(6) wurden bei einer Konzentration von 8 bzw. 40 μg/ml unter den oben genannten Bedingungen transkribiert.

● — 40 μg/ml, ○ — 8 μg/ml

c) Auftragung der Kurven aus a) und b), sowie der relativen ^{32}P Zählrate in Prozent. Die 100 % Werte entsprechen den Meßwerten in Abwesenheit von AF/013.

△ — n(3), 9,75 μg/ml

▲ — D(3), "

○ — D(6), 8 μg/ml

● — D(6), 40 "

■ — relative Zählrate

2.9 Salzabhängigkeit der Transkription

Die Salzabhängigkeit der Transkription wies auf nukleosomaler und nackter DNA mit beiden Polymerasen den gleichen Verlauf auf, weshalb hier die Ergebnisse gemeinsam besprochen werden.

Viele Einzelschritte des Transkriptionsgeschehens unterliegen einem nachweislichen Salzeinfluß (vgl. Schäfer et al., 1973). Dabei kann, z.B. über die Helixstabilität, auch freie DNA als template betroffen sein (Solage u. Cedar, 1976). Die Unterteilung des Salzeinflusses auf template und Polymerase ist allerdings mit Kriterien, die allein auf der Transkription dieses templates durch das Enzym beruhen, prinzipiell nicht möglich.

Die Situation ist bei der Verwendung nukleosomaler templates noch weiter erschwert. Mononukleosomen erfahren bei Ionenstärken zwischen 0 und 600 mM eine Reihe von Konformationsveränderungen, die das Transkriptionsgeschehen beeinflussen könnten (Dieterich et al., 1979; Gordon et al., 1978, 1979; Wu et al., 1979; Martinson et al., 1979; Oudet et al., 1977, 1978). Dazu kommen Konformationsveränderungen, die nukleosomale Überstrukturen betreffen (Strätling, 1979).

Um den Salzeinfluß bei Initiation und Elongation getrennt untersuchen zu können, wurde teilweise in Gegenwart der Initiationsinhibitoren Rifampicin und AF/013 gearbeitet. Die Transkription von Nukleosomen und nackter DNA unter gleichen Bedingungen sollte Information über den Nukleosomen - abhängigen Anteil des Salzeinflusses geben.

Abb. 64 zeigt die Transkription von n(4) mit E. coli RNA Polymerase mit und ohne Rifampicin. Die Rifampicin-resistente Synthese wies zwischen 120 und 600 mM nur eine geringe Abhängigkeit von der Ionenstärke auf. Die Inkorporation ging in diesem Bereich um ein Drittel zurück. Unter Reinitiationsbedingungen war die Transkription wesentlich salzempfindlicher. Ab 450 mM wurde aber keine weitere Abnahme des UMP Einbaus beobachtet. Das Transkriptionsverhalten mit und ohne Rifampicin deckte sich ab dieser Ionenstärke. Die starke Abnahme der Inkorporation unter Reinitiationsbedingungen lag somit an einer Verringerung der Reinitiationswahrscheinlichkeit. Eine Ionenstärke von 450 mM als Schwellenwert, über welchem keine Initiation mehr stattfindet, war bereits in frühen Transkriptionsuntersuchungen gefunden worden (Richardson, 1966; Anthony et al., 1966; Matsukage, 1972).

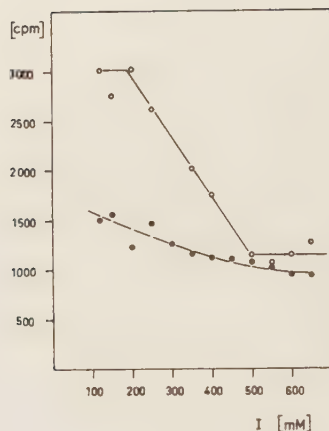


Abb. 64 Salzabhängigkeit der Transkription. E. coli RNA Polymerase auf Nukleosomen.

n(4) wurden bei einer Konzentration von 43,8 $\mu\text{g/ml}$ im Testsystem 4 mit 2,5 μg Enzym vorinkubiert und danach mit $\bullet\text{---}\bullet$, oder ohne $\circ\text{---}\circ$ Rifampicin gestartet. Die Transkriptionsdauer betrug 12 min. Die Nukleosomen befanden sich in 1 mM Tris, 40 mM NaCl, 0,2 mM EDTA, pH 8,0.

Abb. 65 zeigt, daß Nukleosomen verschiedener Länge eine ähnliche Salzcharakteristik aufwiesen, daß diese aber abhing vom P/T Verhältnis. Oligonukleosomen wurden bei den P/T Verhältnissen 2,15 ; 0,71 und 0,14 transkribiert. Dabei wurde bei dem niedrigen Wert von 0,14 praktisch keine Salzabhängigkeit mehr gefunden.

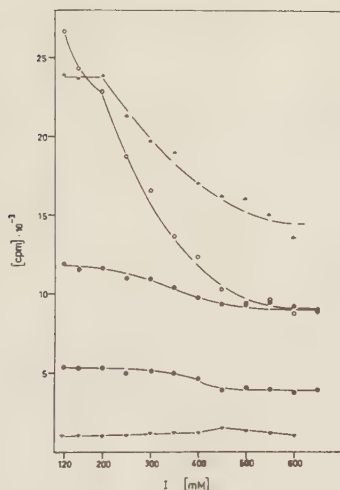


Abb. 65 Salzabhängigkeit der Transkription. *E. coli* RNA Polymerase auf Oligonukleosomen.

n(5) und n(8) wurden bei einer Konzentration von 26,4 $\mu\text{g/ml}$ mit den angegebenen Mengen Enzym im Testsystem 4 vorinkubiert und mit oder ohne Rifampicin gestartet. Die Nukleosomen befanden sich in 0,25 mM AS, 0,1 mM Natriumphosphat, 0,2 mM EDTA, 1 mM Sucrose, pH 7,0.

—△—△	n(8),	P/T = 2,15,	ohne Rifampicin
—▽—▽	n(8),	0,14,	" "
—○—○	n(5),	2,15,	" "
—●—●	n(5),	2,15,	mit Rifampicin
—●—●	n(5),	0,71,	" "

In Gegenwart von Rifampicin findet keine Reinitiation statt. Es liegt zunächst nahe, die leicht Abnahme der Rifampicin-resistenten Synthese mit zunehmender Ionenstärke als Salzeinfluß auf die Elongation zu deuten. Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen aber auch einen anderen Schluß zu. Es war in 2.5.3 versucht worden, die in Abb. 46 dargestellte Transkriptionskinetik in Gegenwart von Rifampicin durch die Existenz eines langsam startenden Initiationskomplexes zu erklären, der zwar resistent gegen Rifampicin sein sollte, bei hohen Ionenstärken entweder schnell starten, oder nicht mehr starten können sollte. Diese Hypothese kann auch zur Erklärung der Salzabhängigkeit der Transkription in Gegenwart von Rifampicin herangezogen werden. Die Abnahme der Rifampicin-resistenten Transkription mit zunehmender Ionenstärke beruhte danach auf dem Zerfall eines Rifampicin-resistenten, aber salzempfindlichen

Initiationskomplexes, der nach den Daten aus Abb. 64 und 65 20 - 30 % aller Rifamicin-resistenten Initiationskomplexe ausmachen sollte.

Die hier dargestellten Ergebnisse kontrastieren mit denen von Williamson und Felsenfeld (1978), die auf mit Histonen rekonstituierter T7 DNA bei einem sehr niedrigen P/T Verhältnis (0,075), aber unter sonst ähnlichen Bedingungen, zwischen 0 und 600 mM NaCl eine zunehmende, maximal achtfache Stimulierung der Transkription fanden. Es bedarf entsprechender Versuche, um zu klären ob das P/T Verhältnis oder die Natur des rekonstituierten Chromatins für die Abweichung verantwortlich ist.

Die Salzabhängigkeit der Transkription mit Pol B (Abb. 66) zeigte nur in einem Punkt eine Abweichung von dem Verhalten wie es für E. coli RNA Polymerase beschrieben worden war : die RNA Synthese war bis 300 mM von Salz unbeeinflusst. Danach nahm die Inkorporation ebenfalls bis 450 mM ab und blieb dort bis 650 mM (höhere Ionenstärken wurden nicht untersucht) konstant. In Gegenwart des Initiationsinhibitors AF/013 bestand kaum eine Abhängigkeit der Transkription von der Ionenstärke. Daß bei 450 mM der Plateauwert der Transkription mit und ohne AF/013 gleich war, kann wieder als starke Salzabhängigkeit der Initiation und geringe Salzabhängigkeit der Elongation gedeutet werden. Die Kurven mit 50 und 100 ug/ml AF/013 decken sich nicht völlig. Dies kann durch den Farbquench der Zählausbeute verursacht worden sein (s. Abb. 63c).

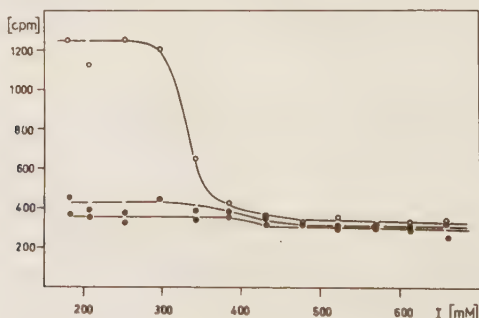


Abb. 66 Salzabhängigkeit der Transkription. Polymerase B auf Oligonukleosomen.

n(6) wurden bei einer Konzentration von 28,75 ug/ml mit 0,09 u (0,4 ug) Pol B im Testsystem 5b) vorinkubiert (Salzkonzentration während der Vorinkubation 95 mM AS) und mit NaCl und AF/013 bzw. reinem DMSO gestartet.

- 0 ug/ml AF/013
- 50 ug/ml "
- 100 ug/ml "

Abb. 67 vergleicht die Salzabhängigkeit der Transkription von Pol B auf Nukleosomen bzw. nackter DNA.

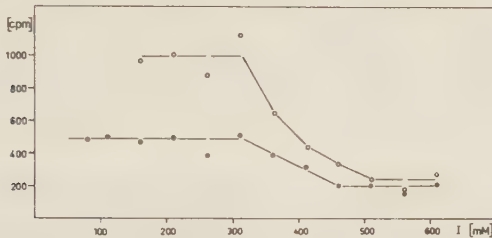


Abb. 67 Salzabhängigkeit der Transkription. Polymerase B auf nukleosomaler und nackter DNA.

D(4) ○ — ○ und n(4) ● — ● wurden bei einer Konzentration von 12,4 µg/ml mit 0,09 (0,4 µg) Enzym in Testsystem 5b 7 min bei 37 °C vorinkubiert (AS Konzentration während der Vorinkubation 37,5 mM AS) und mit UTP und NaCl gestartet (ohne AF/013, DMSO). Transkriptionsdauer 7 min bei 37 °C. Die Nukleosomen befanden sich in 20 mM Natriumphosphat, 40 mM NaCl, 6 mM Ammoniumchlorid, 3 mM TEA, 0,2 mM EDTA, pH 7,0.

Die Transkription war auf beiden templates bis 300 mM von der Ionenstärke unbeeinflusst und nahm dann bis 450 bzw. 500 mM auf einen gemeinsamen Plateauwert ab. Da nach den beschriebenen Experimenten (s.o.) diese Plateauinkorporation als reine Elongation betrachtet werden kann, bedeutet dies, daß spätestens ab 500 mM kein Unterschied in der Elongation auf nukleosomalen und nackten DNA templates besteht. Zwischen 350 und 600 mM findet bei Mononukleosomen eine Auffaltung der Struktur statt (Dieterich et al., 1979). Der Befund, daß nur bei Ionenstärken größer als 500 mM, nicht aber unterhalb 300 mM, das Transkriptionsverhalten gleich war, erlaubt aber noch nicht den Schluß, daß nur bei Ionenstärken größer als 500 mM die Elongation auf beiden templates ununterscheidbar sei. Es kann durch die hier gezeigten Experimente nicht ausgeschlossen werden, daß Pol B auf nukleosomaler und freier DNA unterschiedliche Initiationswahrscheinlichkeiten hat oder daß die Zahl transkribierbarer Moleküle bei gleicher DNA Konzentration für n(i) niedriger liegt als für D(i). Die stärkere Inkorporation auf freier DNA, verglichen mit Oligonukleosomen, zwischen 100 und 300 mM kann sowohl an einer leichteren Elongation bei dieser Ionenstärke als auch an einer höheren Initiationsfrequenz liegen. Die Unterscheidung zwischen den beiden Möglichkeiten erfordert weitere Experimente. Die Daten des nächsten Abschnittes machen die zweite Alternative wahr-

scheinlicher.

2.10 Temperaturabhängigkeit der Transkription mit Polymerase B

Über die Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten kann die Aktivierungsenthalpie eines Reaktionsschrittes bestimmt werden. Die Beziehung zwischen der Geschwindigkeitskonstanten und der Reaktionstemperatur (in K) gibt die Arrheniusgleichung.

$$k = A \cdot e^{-\frac{E}{RT}}$$

k = Geschwindigkeitskonstante
 A = Frequenzfaktor
 E = Aktivierungsenthalpie
 R = allg. Gaskonstante
 T = absol. Temperatur

Aus einer doppelt reziproken Auftragung von $\ln(k)$ gegen $1/T$ kann die die Aktivierungsenthalpie graphisch ermittelt werden.

Der Arrheniusformalismus wurde hier ohne genauere Kenntnis des Reaktionsmechanismus angewandt, um zu untersuchen, ob sich der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Transkription von nackter und nukleosomaler DNA unterscheidet.

Nukleosomale und nackte DNA wurden bei Temperaturen zwischen 20 und 40 °C transkribiert. Als Anfangsgeschwindigkeit wurde die Inkorporation während der ersten 5 min gewertet. Abb. 68 zeigt den Arrhenius plot einer Transkription von $n(5)$ und $D(5)$ mit Polymerase B.

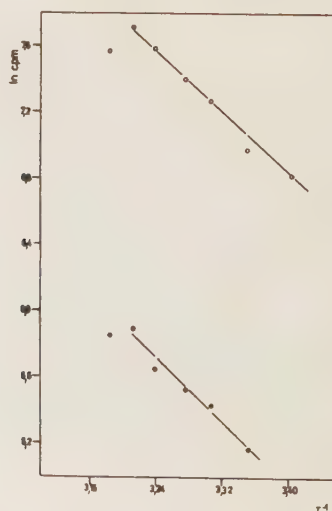


Abb. 68 Temperaturabhängigkeit der Transkription. Arrhenius plot.

n(5) und D(5) wurden in Testsystem 2 bei einer Konzentration von 12,2 $\mu\text{g/ml}$ mit 0,09 u (0,4 μg) Pol B bei verschiedenen Temperaturen 5 min lang transkribiert. Der natürliche Logarithmus ist gegen die reziproke absolute Temperatur aufgetragen. Alle Punkte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

Die Transkriptionsgeschwindigkeit nahm bis 38 C zu. Bei 40 C bewirkte der gegenläufige Einfluß der Enzymdenaturierung eine Abnahme der Transkription. Durch Verwendung eines HEPES Puffersystems wurde der indirekte Einfluß der Temperatur auf das Reaktionsgeschehen über den pH - Wert niedrig gehalten (s. IIIA,2.1).

Die Transkription auf beiden templates wies die gleiche Aktivierungsenthalpie auf. Es ist daher anzunehmen, daß der geschwindigkeitsbestimmende Schritt auf beiden templates übereinstimmt.

Diese Aussage scheint im Widerspruch zu dem Befund zu stehen, daß Polymerase B auf Nukleosomen eine geringere RNA Synthese aufweist als auf nackter DNA (vgl. 2.2, 2.6). Die Ergebnisse sind in Einklang zu bringen, wenn angenommen wird, daß für den Unterschied in der auf den beiden templates synthetisierten RNA Menge nicht der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Transkriptionsmechanismus verantwortlich ist.

Die Einbaurate der Transkription wird bestimmt durch Initiations- (und Terminations-) frequenz und Elongationsgeschwindigkeit. Initiation und Elongation zerfallen ihrerseits in Teilschritte , z.B. Bindung des Enzyms, Öffnung der DNA, Knüpfung der ersten Phosphodiesterbindung, Addition weiterer Nukleotide, Translokation des Enzyms usw., von denen jeder potentiell geschwindigkeitsbestimmend sein kann. Die Geschwindigkeit dieser einzelnen Schritte ist für Polymerase B auch auf einfacheren templates noch weitgehend unbekannt. In der vorliegenden Arbeit (Abschnitt 2.4.) war für E. coli Polymerase auf Nukleosomen und DNA Fragmenten eine Mindestelongationsrate von 1,8 b/s berechnet worden, wobei nicht gesagt werden konnte, ob die Elongationsrate auf beiden templates gleich war. In der Literatur wurden aber für freie DNA ähnliche Werte berechnet (Cedar u. Felsenfeld, 1973 : 1,8 b/s; Solage u. Cedar, 1976a : 1,7 b/s; Bremer u. Conrad, 1964 : 2 - 3 b/s). Dies erlaubt den Schluß, daß die Elongationsraten auf nukleosomaler und freier DNA gleich sind. In der Tat fanden Kozlov u. Georgiev (1970) auf DNP und DNA die gleiche Elongationsgeschwindigkeit von 2,2 b/s. Diese mit E. coli RNA Polymerase erhaltenen Ergebnisse legen nahe, daß auch für die eukaryontische RNA Polymerase B die template Struktur keinen Einfluß auf die Elongation nimmt.

Bei einem Einfluß der template Struktur auf die Initiations-

frequenz kann der Unterschied in der Inkorporation, bei gleicher Aktivierungsenthalpie auf beiden templates, mit einer unterschiedlichen Zahl von Initiationsmöglichkeiten auf $n(i)$ und $D(i)$ erklärt werden, d.h. durch eine unterschiedliche Zahl von transkribierbaren Molekülen (vgl. 2.9). Da der direkte Nachweis gleicher Elongationsraten der Pol B auf $n(i)$ und $D(i)$ noch aussteht, soll über mögliche Ursachen der Begrenzung der Initiationsmöglichkeiten auf Nukleosomen hier nicht spekuliert werden.

IV Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde das Transkriptionsverhalten von Oligonukleosomen und daraus extrahierten DNA Fragmenten mit isolierten RNA Polymerasen aus Eukaryonten und *E. coli* verglichen.

Alle biologischen Komponenten der Transkriptionssysteme (Zellkerne, Polymerasen, templates) wurden gereinigt und weitgehend charakterisiert eingesetzt , um das komplexe Geschehen der Chromatintranskription unter möglichst definierten Bedingungen untersuchen zu können.

Für die Polymerasen B aus Rattenleberzellkernen und Kalbsthymus wurden neue Präparationsmethoden erarbeitet, die bei geringem Zeitaufwand und unter hohen Ausbeuten die Enzyme 150- bzw. 6000-fach anreicherten. Beide Methoden enthalten eine fraktionierte Fällung mit PEG und eine Chromatographie auf Heparin Sepharose und liefern das Enzym aus Rattenleber in 100 % , das aus Kalbsthymus in 60 % Reinheit. Die Verunreinigung der Kalbsthymus Polymerase besteht aus zwei einzelnen Polypeptiden, so daß auch mit dieser Polymerase die Zusammensetzung des Transkriptionssystems bis ins einzelne bekannt war.

In den Transkriptionsversuchen mit *E. coli* RNA Polymerase wurde das gereinigte Holoenzym (Geschenk von Prof. Zillig, Martinsried) eingesetzt.

Der Grad einer möglichen Kontamination der Nukleosomen mit freier DNA wurde in Zusammenarbeit mit Dr. M. Groom, Dr. J. Dubochet, EMBL Heidelberg, und G. Wolf, Köln, elektronenmikroskopisch bestimmt. Die angewandte Untersuchungsmethode erlaubte in Nukleosomenlösungen die Bestimmung eines Anteiles an freier DNA von weniger als 2 %. In Präparationen von Hexa- und Heptanukleosomen lag der Gehalt an freier DNA unter dieser Erfassungsgrenze.

Bei den Transkriptionsexperimenten ergaben sich folgende Befunde :

E. coli RNA Polymerase transkribiert Nukleosomen mit der gleichen Effizienz wie die entsprechenden DNA Fragmente. Dabei findet die Initiation an den DNA Enden statt; die ganze Länge der DNA wird transkribiert. Diese längenmäßig vollständige Transkription des nukleosomalen templates wurde mit drei Kriterien gezeigt :

1. Gelelektrophorese der RNA Transkripte
2. wird eine Serie von Oligonukleosomen unter Ausschluß von Reinitiation transkribiert, so stehen die Transkriptionszeiten bis zum Erreichen des jeweiligen Plateauwertes in einem Verhältnis zueinander, das dem Längenverhältnis der eingesetzten Nukleosomen entspricht.
3. ebenfalls unter Ausschluß von Reinitiation entsprechen die Verhältnisse der Plateauwerte bei der Transkription verschieden langer Oligonukleosomen den Längenverhältnissen

dieser Nukleosomen.

Mit E. coli RNA Polymerase scheint nur ein Bruchteil des eingesetzten Holoenzym in der Lage zu sein, Nukleosomen (oder die entsprechenden DNA Fragmente) zu transkribieren. Es werden Argumente vorgebracht, wonach es sich bei dem transkriptionsaktiven Anteil der Polymerasepräparation um das core Enzym handelt, das in geringen Mengen vorhanden gewesen sein könnte.

Bei erlaubter Reinitiation werden Nukleosomen, wie auch die DNA Fragmente, bis zur Erreichung eines RNA/DNA Verhältnisses von 1 transkribiert. Gründe, die dieses stöchiometrische Verhalten bewirken könnten, wurden diskutiert.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß Nukleosomen die Transkription durch E. coli RNA Polymerase in keiner Weise zu hindern scheinen.

Mit eukaryontischen B Polymerasen weisen Oligonukleosomen eine geringere template Aktivität auf als die entsprechenden DNA Fragmente. Die relative template Effizienz nimmt mit der Länge der Oligonukleosomen ab und wird beeinflusst durch das Polymerase/template Verhältnis im Test. Bei der Transkription von Nukleosomen mit Polymerase B lagen die RNA/DNA Verhältnisse um mehr als einen Faktor 10 niedriger als bei der Transkription mit E. coli RNA Polymerase. Dabei sank die RNA Ausbeute mit wachsender Kettenlänge der Nukleosomen.

Erst bei Ionenstärken über $0,5\text{ M}$ werden Nukleosomen und DNA gleich effizient transkribiert. Die Aktivierungsenthalpie für die Transkription auf beiden templates ist aber schon bei niedrigeren Ionenstärken gleich groß. Die Hypothese wurde aufgestellt, daß Nukleosomen einen Teil der Initiationsorte für Polymerase B unzugänglich machen, daß der Transkriptionsprozeß im übrigen aber durch die Anwesenheit von Nukleosomen unbeeinflusst ist.

Die Möglichkeit, daß Polymerase B nur einen, in Nukleosomenpräparationen möglicherweise enthaltenen, Anteil an nackter DNA transkribiert, konnte ausgeschlossen werden: die relative template Effizienz von Heptanukleosomen beträgt 12 %, der Gehalt an freier DNA liegt unter 2 %.

Serien von Oligonukleosomen erwiesen sich wegen ihrer definierten Natur als geeignetes Modellsystem zur Untersuchung des Transkriptionsverhaltens von Chromatin und führten zu Aussagen, die mit Chromatin selbst nicht zu erhalten gewesen wären.

V Literatur

- Albertson, P.-A. (1971) Partition of Cell Particles and Macromolecules. Almqvist und Wiksell, Stockholm, 2. ed.
- Albertson, P.-A. (1977) Endeavour 1, 69-74
- Altenburger, W., Hörz, W. und Zachau, H. (1975) Nature 264, 517-522
- Anfinsen, C.B., Rumley, M.K. und Taniuchi, H. (1963) Acta Chem. Scand. 17, S 270-S 276
- Anthony, D.P., Zeszotek, F. und Goldthwait, D.A. (1966) Proc. natn. Acad. Science 56, 1026-1033
- Antonoglou, D., Salakidou, H., Haralambidou, E. und Traktellis, A. (1977) Biochem. Biophys. Acta 474, 467-477
- Antonopoulos, C.A. (1962) Acta Chem. Scand. 16, 1521-1522
- Atkinson, A. und Jack, G. W. (1973) Biochem. Biophys. Acta 308, 41-52
- Augenlicht, L. (1978) J. Biol. Chem. 253, 3035-3041
- Axen, R., Porath, J. und Ernback, J. (1967) Nature 214, 1302-1304
- Bakayev, V.V., Bakayeva, T. G. und Varshavsky, A.J. (1977) Cell 11, 619-629
- Barbiroli, E., Monti, M.G., Moruzzi, M.S. und Mezzetti, G. (1977) Biochem. Biophys. Acta 479, 69-79
- Bates, R.G. und Robinson, R.A. (1973) Analyt. Chem. 45, 420
- Beebe, T.J.C. (1979) Biochem. J. 183, 43-54
- Beisenherz, G., Boltze, H.J., Bücher, Th., Czok, R., Garbade, K.H., Mayer-Arendt, E. und Pfeleiderer, G. (1953) Z. Naturforschung B 8, 555-577
- Bellard, M., Gannon, F. und Chambon, P. (1978) Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. 42, 779-791
- Bennet, T.P. (1967) Nature 213, 1131-1132
- Benson, R.H., Spindler, S.R., Hodo, H.G. und Blatti, S.P. (1978) Biochem. 17, 1387-1396
- Bidney, D.L. und Reeck, G.R. (1977) Biochem. 16, 1844-1849
- Birkenmeier, E.H., Brown, D.D. und Jordan, E. (1978) Cell 15, 1077-1086
- Bjursell, G., Gussander, E. und Lindahl, L. (1979) Nature 280, 420-423
- Blair, D.G.R. (1977) Can. J. Biochem. 55, 1117-1120
- Blobel, I.G. und Potter, V.R. (1966) Science 154, 1662-1665
- Bloom, K.S. und Anderson, J.N. (1979) J. Biol. Chem. 254, 10532-10539
- Bock, R.M. (1967) Methods Enzymology 12 A, 224-228 (Grossman, L. und Moldave, K. eds.) A.P., N.Y.
- Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Petlach, M.C., Heynecker, H.L., Boyer, H.W., Crosa, J.H. u. Falkow, S. (1977) Gene 2, 95-113
- Bonner, J., Dahmus, M.E., Fambrough, D., Huang, R.C.C., Marushige, K. und Tuan, D.Y.H. (1968) Science 159, 47-56
- Bonner, W.M. und Laskey, R.A. (1974)

- Eur. J. Biochem. 46, 83-88
- Bonner, W.M. und Stedman, J.D. (1978)
 Analyt. Biochem. 89, 247-256
- Bonner, W.M. und Stedman, J.D. (1979)
 Proc. natn. Acad. Science 76, 2190-2194
- Botchan, P., Wang, J.C. und Echols, H. (1973)
 Proc. natn. acad. Science 70, 3077-3081
- Boulikas, T., Wiseman, J.M. und Garrard, W.T. (1980)
 Proc. natn. Acad. Science 77, 127-131
- Bremer, H. und Konrad, M.W. (1964)
 Proc. natn. Acad. Science 51, 801-808
- Brison, O. und Chambon, P. (1976)
 Analyt. Biochem. 75, 402-409
- Brooks, T.L. und Green, M.H. (1977)
 Nucleic Acids Res. 4, 4261-4277
- Buhler, J.-M., Iborra, F., Sentenac, A. und Fromageot, P.
 (1976) J. Biol. Chem. 251, 1712-1717
- Burgess, R.R. (1969) J. Biol. Chem. 244, 6168-6176
- Burgess, R.R. (1971) Ann. Rev. Biochem. 40, 711-740
- Burgess, R.R. und Jendrisak, J.J. (1975)
 Biochem. 14, 4634-4638
- Burton, K. (1956) Biochem. J. 62, 315-323
- Buss, W.C. und Stalter, K. (1978)
 Biochem. 17, 4825-4832
- Bustin, M. (1978) Nucleic Acids Res. 5, 925-932
- Butt, T.R., Brothers, J.F., Giri, C.P. und Smulson, M.E.
 (1978) Nucleic Acids Res. 5, 2775-2788
- Butt, T.R., Jump, D.B. und Smulson, M.E. (1979)
 Proc. natn. Acad. Science 76, 1628-1632
- Butterworth, P.H.W., Cox, R.F. und Chesterton, C.J. (1971)
 Eur. J. Biochem. 23, 229-241
- Butterworth, P.H.W., Flint, S.J. und Chesterton, C.J. (1973)
 Biochem. Soc. Trans. 1, 650-655
- Carter, C.W. und Levinger, L.F. (1977)
 Biochem. Biophys. Res. Com. 74, 955-960
- Carter, C.W., Levinger, L.F. und Birinyi, F. (1980)
 J. Biol. Chem. 255, 748-754
- Cedar, H. (1975) J. Mol. Biol. 95, 257-269
- Cedar, H. und Felsenfeld, G. (1973)
 J. Mol. Biol. 77, 237-254
- Chamberlin, M.J., Nierman, W.C., Wiggs, J. und Neff, N.
 (1979) J. Biol. Chem. 254, 10061-10069
- Chambon, P. (1975) Ann. Rev. Biochem. 44, 613-638
- Chambon, P. (1978) Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.
 42, 1209-1234
- Chambon, P., Gissinger, F., Kedinger, C., Mandel, J.L.
 und Meilhac, M. (1974) In The Cell Nucleus (Busch, H.
 ed.) 269-308. A.P., N.Y.
- Champoux, J.J. und McConaughty, B.L. (1976)
 Biochem. 15, 4638-4642
- Chan, J.Y.H., Loor, R.M. und Wang, T.Y. (1976)
 Arch. Biochem. Biophys. 173, 564-576
- Chesterton, C.J. und Butterworth, P.H.W. (1971)
 FEBS Lett. 15, 181-185
- Chun, P.W., Fried, M. und Ellis, E.F. (1967)
 Analyt. Biochem. 19, 481-497

- Cleaver, J.E. und Bover, H.W. (1972)
 Biochem. Biophys. Acta 262, 115-124
- Cochet-Meilhac, M., Nuret, P., Courvalin, J.C. und
 Chambon, P. (1974) Biochem. Biophys. Acta 353, 185-192
- Cooper, C.S. und Quincey, R.V. (1979)
 Biochem. J. 177, 825-831
- Corden, F., Engelking, H.M. und Pearson, G.D. (1975)
 Proc. natn. Acad. Science 73, 401-404
- Coupar, B.E.H. und Chesterton, C.J. (1975)
 Eur. J. Biochem. 59, 25-34
- Coupar, B.E.H. und Chesterton, C.J. (1977)
 Eur. J. Biochem. 79, 525-533
- Coupar, B.E.H., Chesterton, C.J. und Butterworth, P.H.W.
 (1977) FEBS Lett. 77, 273-276
- Coupar, B.E.H., Davies, J.A. und Chesterton, C.J. (1978)
 Eur. J. Biochem. 84, 611-623
- Cox, R.F. (1976) Cell 7, 455-465
- CRC Handboock of Biochemistry and Molecular Biology (1976)
 Physical and Chemical Data Vol. 1. 3rd ed.
 Fasman, G.D. ed., CRC Press, Cleveland, Ohio
- Cremisi, C., Chestier, A., Dauguet, C. und Yaniv, M. (1977)
 Biochem. Biophys. Res. Com. 78, 74-82
- Crouse, G.F., Fodor, E.J.B. und Doty, P. (1979)
 Nucleic Acids Res. 5, 371-383
- Cuatrecasas, P., Fuchs, S. und Anfinsen, C.B. (1967)
 J. Biol. Chem. 242, 1541-1547
- Danglot, G., van der Werf, S., Berthelot, N. und Girard, M.
 (1979) Biochimie 61, 931-942
- Davies, K.A. und Walker, I.O. (1977)
 J. Cell Science 26, 267-279
- DePomerai, D.I., Chesterton, C.J. und Butterworth, P.H.W.
 (1974) Eur. J. Biochem. 46, 461-471
- Dezelee, S., Sentenac, A. und Fromageot, P. (1974)
 J. Biol. Chem. 249, 5971-5977
- Dezelee, S., Wyers, F., Sentenac, F. und Fromageot, P.
 (1976) Eur. J. Biochem. 65, 543-552
- Dieterich, A.E., Axel, R. und Cantor, C.R. (1979)
 J. Mol. Biol. 129, 587-602
- DiMauro, E. und Mezzina, M. (1974)
 Arch. Biochem. Biophys. 164, 765-768
- DiMauro, E., Finotti, R. und Pomponi, M. (1977)
 Exp. Cell Res. 105, 207-216
- DiMauro, E., Pedone, F. und Pomponi, M. (1978)
 Biochem. J. 174, 95-102
- Dimitriadis, G.J. und Tata, J.R. (1980)
 Biochem. J. 187, 467-477
- Dixon, M. und Webb, E.C. (1961)
 Adv. Protein. Res. 16, 197-219
- Douvas, A.S., Harrington, C.A. und Bonner, J. (1975)
 Proc. natn. Acad. Science 72, 3902-3906
- Dreyer, C. und Hausen, P. (1976)
 Eur. J. Biochem. 70, 53-74
- Dubochet, J., Ducommun, M., Zollinger, M. und Kellenberger, E.
 (1971) J. Ultrastructural Res. 35, 147-167
- Dynan, W.S. und Burgess, R.R. (1979)
 Biochem. 13, 4581-4586

- Dynan, W.S., Jendrisak, J.J. und Burgess, R.R. (1977)
Analyt. Biochem. 79, 181-189
- Elgin, S.C.R. und Weintraub, H. (1975)
Ann. Rev. Biochem. 44, 725-774
- Engelke, D.R., Ng, S.-Y., Shastry, B.S. und Roeder, R.G.
 (1980) *Cell* 19, 717-728
- Felsenfeld, G. (1978) *Nature* 271, 115-122
- Finch, J.T. und Klug, A. (1976)
Proc. natn. Acad. Science 73, 1897-1901
- Finch, J.T., Lutter, L.C., Rhodes, D., Brown, R.S., Rushton, B., Levitt, M. und Klug, A. (1977) *Nature* 269, 29-36
- Flint, S.J., DePomerai, D.I., Chesterton, C.J. und Butterworth, P.H.W. (1974) *Eur. J. Biochem.* 42, 567-579
- Fodor, E.J.B. und Doty, P. (1977)
Biochem. Biophys. Res. Com. 77, 1478-1485
- Foster, P.R., Dunnill, P. und Lilly, M.D. (1973)
Biochim. Biophys. Acta 317, 505-516
- Franke, W.W., Scheer, U., Trendelenburg, M.F., Spring, H. und Zentgraf, H. (1976) *Cytobiol.* 13, 401-434
- Fried, M. und Chun, P.W. (1971)
Methods Enzymology 22, 238-247 (Jacoby, W.B. ed.)
 Academic Press N.Y.
- Fuchs, E., Zillig, W., Hofschneider, P.H. und Preuss, A.
 (1964) *J. Mol. Biol.* 10, 546-550
- Fuchs, E., Millette, R.L., Zillig, W. und Walter, G. (1967)
Eur. J. Biochem. 3, 183-193
- Fujimoto, M., Kalinki, A., Pritchard, A.E., Kowalski, D., Laskowski, M. Sr. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 7405-7410
- Fukasawa, H., Miyata, T. und Yamaguchi, M. (1977)
Biochem. Biophys. Res. Com. 79, 618-624
- Garel, A. und Axel, R. (1976)
Proc. natn. Acad. Science 73, 3966-3970
- Gariglio, P., Llopis, R., Oudet, P. und Chambon, P. (1979)
J. Mol. Biol. 131, 75-105
- Geraci, G. und Noviello, L. (1979)
Cell Diff. 8, 203-210
- Giri, C.P. und Gorovsky, M.A. (1980)
Nucleic. Acids Res. 8, 197-217
- Gissinger, F. und Chambon, P. (1975)
FEBS Lett. 58, 53-56
- Gissinger, F., Keding, C. und Chambon, P. (1974)
Biochimie 56, 319-333
- Glasser, S.R. und Spelsberg, T.C. (1972)
Biochem. Biophys. Res. Com. 47, 951-958
- Goldberg, M.I., Perriard, J.C. und Rutter, W.J. (1977)
Biochem. 16, 1655-1665
- Gordon, V.C., Knobler, C.M., Olins, D.E. und Schumaker, V.N.
 (1978) *Proc. natn. Acad. Science* 75, 660-663
- Gordon, V.C., Schumaker, V.N., Olins, D.E., Knobler, C.M. und Horwitz, J. (1979) *Nucleic Acids Res.* 6, 3845-3856
- Gottesfeld, J.M. und Melton, D.A. (1978)
Nature 273, 317-319
- Grade, K., Schonheit, C. und Lindigkeit, R. (1977)
Acta Biologica et Medica Germanica 36, 29-34
- Green, M.H. und Brooks, T.L. (1977)
Nucleic Acids Res. 4, 4279-4289

- Greenleaf, A.L. und Bautz, F.K.F. (1975)
Eur. J. Biochem. 60, 169-179
- Greenleaf, A.L., Haars, R. und Bautz, F.K.F. (1976)
FEBS Lett. 71, 205-208
- Griffith, J.D. (1976)
Proc. natn. Acad. Science 73, 563-567
- Griffith, J.D. (1978) Biopolymers 17, 237-241
- Groner, Y., Monroy, G., Jacquet, M. und Hurwitz, J. (1975)
Proc. natn. Acad. Science 72, 194-199
- Guilfoyle, T.J. und Key, J.L. (1977)
Biochem. Biophys. Res. Com. 74, 308-313
- Guilfoyle, T.J. und Jendrisak, J.J. (1978)
Biochem. 17, 1860-1866
- Hare, D.L., Stimpson, D.I. und Cann, J.R. (1976)
Arch. Biochem. Biophys. 187, 274-275
- Hartree, E.F. (1972) Analyt. Biochem. 48, 422-427
- Harvey, S.R. und Libby, P.R. (1976)
Biochim. Biophys. Acta 429, 742-749
- Heil, A. und Zillig, W. (1970)
FEBS Lett. 11, 165-168
- Henson, P. (1973) J. Mol. Biol. 119, 487-506
- Hentschel, C.C. und Tata, J.R. (1977)
Develop. Biol. 57, 293-304
- Hewish, D.R. und Burgoyne, L.A. (1973)
Biochem. Biophys. Res. Com. 52, 504-510
- Hinkle, D.C., Ring, J. und Chamberlin, M.J. (1972)
J. Mol. Biol. 70, 197-207
- Hinkle, D.C. und Chamberlin, M.J. (1972)
J. Mol. Biol. 70, 187-195
- Hodo III, H.G. und Blatti, S.P. (1977)
Biochem. 16, 2334-2343
- Holmer, E., Söderström, G. und Anderson, L.-O. (1979)
Eur. J. Biochem. 93, 1-5
- Holmes, W.M., Hurd, R.E., Reid, B.R., Rimerman, R.A. und
Hatfield, G.W. (1975) Proc. natn. Acad. Science
72, 1068-1071
- Hossenlopp, P., Oudet, P. und Chambon, P. (1974)
Eur. J. Biochem. 41, 397-411
- Hossenlopp, P., Wells, D. und Chambon, P. (1975)
Eur. J. Biochem. 58, 237-251
- Howk, R.S., Williams, D.R., Haberman, A.B., Parks, W.P. und
Scolnick, E.M. (1974) Cell 3, 15-22
- Hozier, J., Renz, M. und Nehls, P. (1977)
Chromosoma 62, 301-317
- Humphries, S.E., Young, D. und Carroll, D. (1979)
Biochem. 18, 3223-3231
- Hurst, R.E., Menter, J.M., West, S.S., Settine, J.M. und
Coyne, E.H. (1979) Biochem. 18, 4283-4287
- Iborra, F., Huet, J., Breant, B., Sentenac, A. und
Fromageot, P. (1979) J. Biol. Chem. 254, 10920-10924
- Ingham, K.C. (1978) Arch. Biochem. Biophys. 186, 106-113
- Ingles, C.J. (1973) Biochem. Biophys. Res. Com. 55, 364-371
- Iverius, P.H. (1971) Biochem. J. 124, 677-683
- Jackson, S.G. und McCandless, E.C. (1978)
Analyt. Biochem. 90, 802-808
- Jacob, S.T., Sajdel, E.M., Muecke, W. und Munro, H.N. (1970)

- Cold Spring Harbour Sym. Quant. Biol. 35, 661-691
- Jacob, S.T., Sajdel, E.M. und Mupro, H.N. (1971)
Adv. Enz. Regul. 9, 169-181
- Jacques, L.B. (1979) Science 206, 528-533
- Jaehning, J.A., Woods, P.S. und Roeder, R.G. (1977)
J. Biol. Chem. 252, 8762-8771
- Jendrisak, J.J. und Burgess, R.R. (1977)
Biochem. 16, 1959-1964
- Johnson, E.M., Allfrey, V.G., Bradbury, E.M. und Matthews, H.R. (1978) Proc. natn. Acad. Science 75, 1116-1120
- Johnson, L.K., Strehler, B.L. und O'Brien, T.J. (1978)
Biochim. Biophys. Acta 519, 428-439
- Jorcano, J.L. und Ruiz-Carrillo, A. (1979)
Biochem. 18, 768-774
- Juckes, I.R.M. (1971) Biochim. Biophys. Acta 229, 535-546
- Juhasz, P.P., Benecke, B.J. und Seifart, K.H. (1972)
FEBS Lett. 27, 30-34
- Kastern, W.H., Eldridge, J.D. und Mullinix, K.P. (1979)
J. Biol. Chem. 254, 7368-7376
- Keck, K. (1956) Arch. Biochem. Biophys. 63, 446-451
- Kedinger, C., Nuret, P. und Chambon, P. (1971)
FEBS Lett. 15, 169-174
- Kediger, C., Gissinger, F., Gniazdowski, M., Mandel, J.L. und Chambon, P. (1972) Eur. J. Biochem. 28, 269-276
- Kedinger, C., Gissinger, F. und Chambon, P. (1974)
Eur. J. Biochem. 44, 421-436
- Keichline, L.D. und Wassarman, P.M. (1979)
Biochem. 18, 214-219
- Kellas, B.L., Austoker, J.L., Beebee, T.J.C. und Butterworth, P.H.W. (1977) Eur. J. Biochem. 72, 583-594
- Keller, W. und Wendel, I. (1974)
Cold Spring Harbour Sym. Quant. Biol. 39, 199-208
- Kharchenko, E.P. und Tsyplenkov, P.V. (1979)
Biochem. USSR 43, 1616-1618
- Kirkegaard, L.H., Johnson, T.J.A. und Bock, R.M. (1972)
Analyt. Biochem. 50, 122-138
- Kittlaus, W. (1980) Dissertation Ludwig Maximilian Universität, München
- Klevan, L. und Crothers, D.M. (1977)
Nucleic Acids Res. 4, 4077-4089
- Kokileva, L.B. (1979) Mol. Biol. Rep. 5, 171-174
- Laemmli, U.K. (1975) Proc. natn. Acad. Science 72, 4288-4292
- Kornberg, R.D. (1974) Science 184, 868-871
- Kornberg, R.D. (1977) Ann. Rev. Biochem. 46, 931-954
- Kornberg, R.D. und Thomas, J.O. (1974)
Science 184, 865-868
- Kozlov, Y.V. und Georgiev, G.P. (1970)
Nature 228, 245-247
- Krakow, J.S., Daley, K. und Fronk, E. (1968)
Biochem. Biophys. Res. Com. 32, 98-104
- Kranias, V.G. und Jungmann, R.A. (1978)
Biochim. Biophys. Acta 517, 439-446
- Kuo, K.T., Sahasrabudde, C.G. und Saunders, G.F. (1976)
Proc. natn. Acad. Science 73, 1572-1575
- Lacy, E. und Axel, R. (1975)
Proc. natn. Acad. Science 72, 3978-3982

- Laemmli, U.K. und Favre, M. (1973)
J. Mol. Biol. 80, 575-599
- Laird, C.D., Wilkinson, L.E., Foe, V.E. und Chooi, W.Y.
 (1976) *Chromosoma* 55, 169-192
- Lamb, M.M. und Daneholt, B. (1979)
Cell 17, 835-848
- Laskey, R.A. und Mills, A.D. (1977)
FEBS Lett. 82, 314-316
- Lawrence, J.-J., Chan, D.C.F. und Piette, L.H. (1976)
Nucleic Acids Res. 3, 2879-2893
- Lazarides, E. und Lindberg, U. (1974)
Proc. natn. Acad. Science 71, 4742-4746
- Leibovitch, S.A., Leibovitch, M.-P., Kruh, J. und Harel, J.
 (1979) *Eur. J. Biochem.* 9, 327-333
- LePecq, J.-B. und Paoletti, C. (1966)
Analyt. Biochem. 17, 100-107
- Lerman, L.S. (1971) *Proc. natn. Acad. Science* 68, 1886-1890
- Lescure, B., Chestier, A. und Yaniv, M. (1978a)
J. Mol. Biol. 124, 73-85
- Lescure, B., Dauguet, C. und Yaniv, M. (1978b)
J. Mol. Biol. 124, 87-96
- Levinger, L.F. und Carter, C.W.jr. (1979)
J. Biol. Chem. 254, 9477-9487
- Levy, S. und Simpson, R.T. (1973)
Nature New Biol. 241, 139-141
- Levy-Wilson, B. und Dixon, G.H. (1978)
Nucleic Acids Res. 5, 4155-4163
- Lewis, P.N. (1977) *Can. J. Biochem.* 55, 736-746
- Lilley, D.M.J. und Berendt, A.R. (1979)
Biochem. Biophys. Res. Com. 90, 917-924
- Lilley, D.M.J. und Houghton, M. (1979)
Nucleic Acids Res. 6, 507-523
- Lilley, D.M.J., Jacob, M.F. und Houghton, M. (1979)
Nucleic Acids Res. 7, 377-399
- Lindberg, M.U. und Skoog, L. (1970)
Eur. J. Biochem. 13, 326-335
- Lipps, H.J. und Morris, N.R. (1977)
Biochem. Biophys. Res. Com. 74, 230-234
- Lipps, H.J. und Steinbrück, G. (1978)
Chromosoma 69, 21-26
- Lipps, H.J., Nock, A., Riewe, M. und Steinbrück, G. (1978)
Nucleic Acids Res. 5, 4699-4709
- Littau, V.C., Allfrey, V.G., Frenster, J.H. und Mirsky, A.E.
 (1964) *Proc. natn. Acad. Science* 52, 93-100
- Lohr, D. und Ide, G. (1979)
Nucleic Acids Res. 6, 1909-1927
- Lutter, L.C. (1978) *J. Mol. Biol.* 124, 391-420
- Machicao, F. und Sonnenbichler, J. (1977)
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 358, 141-147
- Majumdar, A.P.N. (1978) *Experientia* 34, 1258-1259
- Mandel, J.L. und Chambon, P. (1971)
FEBS Lett. 15, 175-180
- Mandel, J.L. und Chambon, P. (1974a)
Eur. J. Biochem. 41, 367-372
- Mandel, J.L. und Chambon, P. (1974b)
Eur. J. Biochem. 41, 379-395

- Mandel, R. und Fasman, G.D. (1976)
Nucleic Acids Res. 3, 1839-1855
- Maniatis, T., Jeffrey, A. und Van de Sande, H. (1975)
Biochem. 14, 3787-3794
- Marion, C. und Roux, B. (1978)
Nucleic Acids Res. 5, 4431-4449
- Martin, D.Z., Todd, R.D., Lang, D., Pei, P.N. und
Garrard, W.T. (1977) J. Biol. Chem. 252, 8269-8277
- Martinson, H.G., True, R.J. und Burch, J.B.E. (1979)
Biochem. 18, 1062-1089
- Marushige, K. und Bonner, J. (1966)
J. Mol. Biol. 15, 160-174
- Maryanka, D., Cowling, G.J., Allan, J., Fey, S.J. Huvos, P.
und Gould, H.J. (1979) FEBS Lett. 105, 131-136
- Marzluff, W.F., Murphy, E.C.jr. und Huang, R.C.C. (1973)
Biochem. 12, 3440-3446
- Mathis, D.J., Oudet, P., Wasyslyk, B. und Chambon, P. (1978)
Nucleic Acids Res. 5, 3523-3547
- Matsukage, A. (1972) Mol. Gen. Genetics 118, 11-22
- Mattoccia, E., Baldi, M.I., Carrara, G., Fruscoloni, P.,
Benedetti, P. und Tocchini-Valentini, G.P. (1979)
Cell 18, 643-648
- McMasters, G.K. und Carmichael, G.G. (1977)
Proc. natn. Acad. Science 74, 4835-4838
- Meilhac, M., Tysper, S. und Chambon, P. (1972)
Eur. J. Biochem. 28, 291-300
- Meneguzzi, M., Pignatti, P.f., Barranti-Brodano, G. und
Milanesi, G. (1978) Proc. natn. Acad. Science
75, 1126-1130
- Meneguzzi, G., Chenciner, N. und Milanesi, G. (1979)
Nucleic Acids Res. 6, 2947-2960
- Miki, B.L.A. und Neelin, J.M. (1980)
Nucleic Acids Res. 8, 529-542
- Miller, O.L.jr. und Hodge, D.L. (1975)
J. Cell Biol. 67, 284 a
- Mishima, Y., Matsui, T. und Muramatsu, M. (1979)
J. Biochem. 85, 807-818
- Mitrayev, A.B. und Belous, A.M. (1979)
Biochem. USSR 43, 911-915
- Monjardino, J. und James, A. (1978)
Biochem. Biophys. Res. Com. 84, 618-626
- Morris, N.R. (1976a) Cell 8, 357-363
- Morris, N.R. (1976b) Cell 9, 527-532
- Nelson, D.A., Oosterhof, D.K. und Rill, R.L. (1977)
Nucleic Acids Res. 4, 4223-4234
- Nelson, P.P., Albright, S.C. und Garrard, W.T. (1979)
J. Biol. Chem. 254, 9194-9199
- Nierman, W.C. und Chamberlin, M.J. (1979)
J. Biol. Chem. 254, 7921-7926
- Nohara, H., Mizuno, T. und Iizuka, K. (1973)
Biochim. Biophys. Acta 319, 55-61
- Noll, H. (1967) Nature 215, 360-363
- Noll, M. (1974) Nature 251, 249-251
- Noll, M. (1976) Cell 8, 349-355
- Noll, M. und Kornberg, R.D. (1977)
J. Mol. Biol. 109, 393-404

- Noll, M., Thomas, J.O. und Kornberg, F.D. (1975)
Science 187, 1203-1206
- Nordenman, B., Danielsson, A. und Björk, I. (1978)
Eur. J. Biochem. 90, 1-6
- Novello, F. und Stirpe, F. (1969)
Biochem. J. 112, 721-727
- Ogston, A.G. (1958) Trans. Faraday. Soc. 54, 1754-1757
- Olins, A.L. und Olins, D.E. (1974)
Science 183, 330-332
- Olins, A.L., Carlson, R.D., Wright, E.B. und Olins, D.E.
(1976) Nucleic Acids Res. 3, 3271-3291
- Onishi, T. und Muramatsu, M. (1972)
Biochem. J. 128, 1361-1364
- Ord, M.G. und Stocken, L.A. (1978)
Biochem. J. 176, 615-618
- Osuna, C., Renart, J. und Sebastian, J. (1977)
Biochem. Biophys. Res. Com. 78, 1390-1396
- Oudet, P., Germond, J.E., Bellard, M., Spadafora, C. und
Chambon, P. (1978) Phil. Trans. Royal. Soc. B. 283,
241-258
- Oudet, P., Spadafora, C. und Chambon, P. (1978)
Cold Spring Harbour Sym. Quant. Biol. 42, 301-312
- Palter, K.B. und Alberts, B.M. (1979)
J. Biol. Chem. 254, 11160-11169
- Palter, K.B., Foe, V.E. und Alberts, B.M. (1979)
Cell 18, 451-467
- Pardon, J.F., Wilkins, M.H.F. und Richards, B.M. (1967)
Nature 215, 508-509
- Parker, C.S. und Roeder, R.G. (1977)
Proc. natn. Acad. Science 74, 44-48
- Pays, E. (1977) Biochem. J. 165, 237-245
- Pays, E. und Ronnse, A. (1973)
Eur. J. Biochem. 40, 119-131
- Pederson, T. (1978) Intern. Rev. Cytology 55, 1-22
- Pederson, T. und Bhargjee, J.S. (1979)
J. Mol. Biol. 128, 451-480
- Petrovic, S.L., Petrovic, J.S. und Markovic, R.A. (1974)
Präp. Biochem. 4, 509-522
- Pflugfelder, G. (1977) Diplomarbeit, Albert Ludwig
Universität, Freiburg
- Pflugfelder, G. und Sonnenbichler, J. (1978)
FEBS Lett. 93, 361-364
- Polson, A. (1977) Präp. Biochem. 7, 129-154
- Polson, A., Potgieter, G.M., Largier, J.F., Mears, G.E.F. u.
Joubert, F.J. (1964) Biochim. Biophys. Acta 62, 463-475
- Puvion-Dutilleul, F., Puvion, E. und Bernhard, W. (1978)
J. Ultrastruct. Res. 63, 118-131
- Record, M.T.jr., Lohman, T.M. und DeHaseth, P. (1976)
J. Mol. Biol. 107, 145-158
- Reeves, R. (1976) Science 194, 529-532
- Renz, M. (1979) Nucleic Acids Res. 6, 2761-2767
- Richardson, J.P. (1966) J. Mol. Biol. 21, 83-114
- Riva, S., Fietta, A. und Silvestri, L.G. (1972)
Biochem. Biophys. Res. Com. 49, 1263-1271
- Roeder, R.G. (1974) J. Biol. Chem. 249, 241-248
- Roeder, R.G. (1976) in RNA Polymerasen (Losick, R.,

- Chamberlin, M. eds.) 265-329
Cold Spring Harbour Press
- Roeder, R.G. und Rutter, W.J. (1969)
Nature 224, 234-237
- Rose, K.M., Ruch, P.A. und Jacob, S.T. (1975)
Biochem. 14, 3598-3604
- Rosenberg, R.D. und Lam, L. (1979)
Proc. natn. Acad. Science 76, 1218-1222
- Rouviere-Yaniv, J., Yaniv, M. und Germond, J.-E. (1979)
Cell 17, 265-274
- Ruiz-Carrillo, A., Jorcano, J.L., Eder, G. und Lurz, R.
(1979) Proc. natn. Acad. Science 76, 3284-3288
- Sahasrabuddhe, C.G. und Saunders, G.F. (1977)
Nucleic Acids Res. 4, 853-866
- Sanders, M.M. (1978) J. Cell Biol. 79, 97-109
- Sanders, M.M. und Hsu, J.T. (1977)
Biochem. 16, 1690-1695
- Saragosti, S., Lescure, B. und Yaniv, M. (1979)
Biochem. Biophys. Res. Com. 88, 1077-1084
- Sarma, M.H., Feman, E.R. und Baglioni, C. (1976)
Biochim. Biophys. Acta 418, 29-38
- Schäfer, R., Zillig, W. und Zechel, K. (1973)
Eur. J. Biochem. 33, 207-214
- Scheer, U. und Zentgraf, H. (1978)
Chromosoma 69, 243-254
- Schlegel, R.A., Haye, K.R., Litwack, A.H. und Phelbs, B.M.
(1980) Biochim. Biophys. Acta 606, 316-330
- Schmincke, C.D. und Hausen, P. (1973)
Z. Naturforschung C 28, 610-613
- Seif, I., Khoury, G. und Dhar, R. (1979)
Cell 18, 963-977
- Seifart, K.H. und Sekeris, C.E. (1969)
Eur. J. Biochem. 7, 408-412
- Seifart, K.H., Benecke, B.J. und Juhasz, P.P. (1972)
Arch. Biochem. Biophys. 151, 519-532
- Seifart, K.H., Juhasz, P.P. und Benecke, B.J. (1973)
Eur. J. Biochem. 33, 181-191
- Setaro, F. und Morley, C.G.D. (1976)
Analyt. Biochem. 71, 313-317
- Shani, M., Birkenmeier, E., May, E. und Salzman, N.P.
(1977) J. Virol. 23, 20-28
- Shaw, P.A., Sahasrabuddhe, C.G., Hodo III, H.G. und
Saunders, G.F. (1978) Nucleic Acids Res. 5, 2999-3012
- Shea, M. und Kleinsmith, L.J. (1973)
Biochem. Biophys. Res. Com. 50, 473-477
- Shields, D. und Tata, J.R. (1976)
Eur. J. Biochem. 64, 471-480
- Shimamoto, N. und Wu, C.-W. (1980)
Biochem. 19, 842-848
- Shure, M. und Vinograd, J. (1976)
Cell 8, 215-226
- Simpson, R.T. (1978) Nucleic Acids Res. 5, 1109-1119
- Sippel, A. und Hartmann, G. (1968)
Biochim. Biophys. Acta 157, 218-219
- Sippel, A. und Hartmann, G. (1970)
Eur. J. Biochem. 15, 152-157

- Smith, S.S. und Braun, F. (1978)
Eur. J. Biochem. 62, 309-320
- Smith, S.S., Kelly, K.H. und Jockusch, B.M. (1979)
Biochem. Biophys. Res. Com. 86, 161-166
- Solage, A. und Cedar, H. (1976)
Nucleic Acids Res. 2207-2222
- Sollner-Webb, B., Melchior jr., W. und Felsenfeld, G. (1978)
Cell 14, 611-627
- Sonnenbichler, J. (1974) Naturwissenschaften 61, 317-324
- Sonnenbichler, J. (1979) Naturwissenschaften 66, 244-250
- Sonnenbichler, J., Machicao, F. und Zetl, I. (1977)
in Methods Cell Biol. 15, 149-162
- Spadafora, C., Cudet, P. und Chambon, P. (1979)
Eur. J. Biochem. 100, 225-235
- Spelsberg, T.C. und Hnilica, L.S. (1971)
Biochim. Biophys. Acta 228, 202-211
- Spindler, S.R. (1979) Biochem. 18, 4042-4048
- Stein, A. (1979) J. Mol. Biol. 130, 103-134
- Stein, H. und Hausen, P. (1969)
Science 166, 393-395
- Stein, H. und Hausen P. (1970)
Cold Spring Harbour Sym. Quant. Biol. 35, 709-717
- Steinmetz, M., Streeck, R.E. und Zachau, H.G. (1978)
Eur. J. Biochem. 83, 615-628
- Sternbach, H., Engelhardt, R. und Lezius, A.G. (1975)
Eur. J. Biochem. 60, 51-55
- Stewart, B.W., Huang, P.H.T. und Brian, M.J. (1979)
Biochem. J. 179, 341-352
- Strätling, W.H. (1976) Nucleic Acids Res. 3, 1203-1212
- Strätling, W.H. (1979) Biochem. 18, 596-603
- Strätling, W.H., Müller, U. und Zentgraf, H. (1978)
Exp. Cell Res. 117, 301-311
- Streeck, R.E. und Zachau, H.G. (1978)
Eur. J. Biochem. 89, 267-279
- Sutcliffe, J.G. (1978) Nucleic Acids Res. 5, 2721-2728
- Tata, J.R. und Baker, B. (1978)
J. Mol. Biol. 118, 249-272
- Teissere, M., Penon, P., Azou, Y. und Ricard, J. (1977)
FEBS Lett. 82, 77-81
- Thoma, F., Koller, Th. und Klug, A. (1979)
J. Cell Biol. 83, 403-427
- Thomas, J.O. und Thompson, R.J. (1977)
Cell 10, 633-640
- Thomas, P., Davies, P. und Griffiths K. (1977)
Biochem. J. 166, 189-198
- Todhunter, J.A., Weissbach, H. und Brot, N. (1978)
J. Biol. Chem. 253, 4514-4516
- Tsai, M.J. und Saunders, G.F. (1973)
Proc. natn. Acad. Science 70, 2072-2076
- Udvardy, A. und Seifart, K.H. (1976)
Eur. J. Biochem. 62, 353-363
- Valenzuela, P., Bull, P., Zaldivar, J., Venegas, A. und Martial, J. (1978) Biochem. Biophys. Res Com. 81, 562-566
- Varsnavsky, A.J., Ilyin, Y.V. und Georgiev, G.P. (1974)
Nature 250, 602-606

- Varshavsky, A.J., Pakayev, V.V., Ilvin, Y.V., Pavev jr.,
A.A. und Georgiev, G.P. (1975)
Eur. J. Biochem. 66, 211-223
- Vega, C.A. und Bates, R.G. (1976)
Analyt. Chem. 48, 1293-1296
- Vogt, V. (1969) Nature 223, 854-855
- Voordouw, G. und Eisenberg, H. (1978)
Nature 273, 446-448
- Walter, G., Zillig, W., Palm, P. und Fuchs, E. (197)
Eur. J. Biochem. 3, 194-201
- Wang, J.C. (1979) Proc. natn. Acad. Science 76, 200-203
- Wasylyk, B. und Chambon, P. (1979)
Eur. J. Biochem. 98, 317-327
- Wasylyk, B. und Chambon, P. (1980)
Eur. J. Biochem. 103, 219-226
- Wasylyk, B., Thevenin, G., Oudet, P. und Chambon, P. (1979)
J. Mol. Biol. 128, 411-440
- Wasylyk, B., Keding, C., Corden, J., Brison, O. und
Chambon, P. (1980) Nature 285, 367-372
- Weaver, R.F., Blatti, S.P. und Rutter, W.J. (1971)
Proc. natn. Acad. Science 68, 2994-2999
- Weil, P.A. und Blatti, S.P. (1975)
Biochem. 14, 1636-1642
- Weil, P.A., Segall, J., Harris, B., Ng, S.-Y. und Roeder,
R.G. (1979a) J. Biol. Chem. 254, 6163-6173
- Weil, P.A., Luse, D.S., Segall, J. und Roeder, R.G.
(1979b) Cell 469-484
- Weintraub, H. (1978) Nucleic Acids Res. 5, 1179-1188
- Weintraub, H. und Groudine, M. (1976)
Science 193, 848-856
- Weischet, W.O., Allen, J.R., Riedel, G. und van Holde, K.E.
(1979) Nucleic Acids Res. 6, 1843-1862
- Weiss, S.B. (1960) Proc. natn. Acad. Science 46, 1020-1030
- Williamson, P. und Felsenfeld, G. (1978)
Biochem. 17, 5695-5705
- Wittig, B. und Wittig, S. (1978)
Biochim. Biophys. Acta 520, 598-611
- Woodcock, S.L.F. (1973) J. Cell Biol. 59, 368 a
- Woodcock, C.L.F. und Frado, L. (1975)
Biochem. Biophys. Res. Com. 66, 407-410
- Worthington Enzyme Manual (1972)
Worthington Biochem. Corp., Freehold, N.J.
- Wu, G.-J. (1978) Proc. natn. Acad. Science 75, 2175-2179
- Wu, G.-J. (1980) J. Biol. Chem. 255, 251-258
- Wu, H.-M., Dattagupta, N., Hogan, M. und Crothers, D.M.
(1979) Biochem. 18, 1360-1366
- Yang, R.C.A. und Wu, R. (1979)
Proc. natn. Acad. Science 76, 1179-1183
- Yu, F.L. (1974) Nature 251, 344-346
- Yu, F.L. (1975) Biochem. Biophys. Res. Com. 64, 1107-1115
- Yukioka, M., Omori, K., Okai, Y. und Inone, A. (1979)
FEBS Lett. 104, 169-172
- Zillig, W., Zechel, K. und Halbwachs, H.J. (1970)
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 351, 221-224
- Zimmer, S.G. und Milette, R.L. (1975)
Biochem. 14, 300-307

Zongze, V. und Mathias, A.P. (1979)
Biochem. J. 179, 291-296

Danksagungen

gedankt sei

für Hilfsbereitschaft, gute Laboratmosphäre, Diskussionen und allzeitige Unterstützung meinem Chef Dr. Johann Sonnenbichler und den Kolleginnen und Kollegen Isolde Zetl, Traudl Schild, Elke Seyfert-Schiller, Doris Ollig, Allmuth Röglin, Inge Schreck, Willi Hilpert, doctorisque Fausto Machicao, Heinrich Rosen, Werner Kittlaus

für Mitarbeit an halbgenen Projekten (Polymerase B aus Ratte, X-linking von Nukleosomen, Topoisomerasen aus Ratte und Kalbsthymus den Tübinger Studenten Hellmuth Köhler, Hans-Gerhardt Burgert, Manfred Frasch, Joachim Pfeifle, Werner Mayer, Klaus Hamprecht, Sabine Sturm, Mathias Schube, Enzo Manna

für Programme und Hilfe bei der Computerzählung Werner Mayer, Dr. Valet sowie Herrn Hoffmann und Frau Fischer vom Rechenzentrum

für großzügige Geschenke Dr. I. Grummt, Martinsried (E.coli HB101 mit pBR322), Prof. Zillig, Martinsried (E.coli Polymerase), Prof. Rembold, Martinsried (Benzidin), Dr. Streeck, München (Restriktionsfragmente), Fa. Maddaus, Köln (Amanitin), Fa. Lepetit, Mailand (AF/013).

für Zusammenarbeit an einem EM Projekt Dr. Michael Groom, Dr. Jacques Dubochet, Heidelberg und Frau Gudrun Wolf, Köln, der noch für mehr gedankt wird.

Prof. Chambon, Straßburg, für die Übersendung von Typoskripten vor der Publikation

Lebenslauf

7. 7. 1951 geboren in Duisburg
- 1957 - 1970 Schulbesuch in Freiburg
Abitur am Keplergymnasium
- 1970 - 1977 Studium der Chemie in Freiburg
WS 1972/73 in Lund/Schweden
29. 4. 1977 diplomiert als Chemiker mit einer Arbeit
über die Eigenschaften einer 2,5-dioxo-
pentansäure : NAD(P) oxidoreductase
E.C.1.2.1.26 aus *Pseudomonas fluorescens*
- ab Mai 1977 Promotion am Max Planck Institut für
Biochemie in Martinsried unter der
Leitung von P.D. Dr. Sonnenbichler

